

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR  
MERIEM DJERAI

DIFFÉRENTES SENSIBILITÉS DU TRANSPORT D'ÉLECTRONS ET DU  
GRADIENT TRANSMEMBRANAIRE DE PROTONS DANS LES THYLACOÏDES  
D'ÉPINARD SOUMIS AU STRESS OXYDATIF ET À L'ACIDE SALICYLIQUE

MARS 2015

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie Dieu pour m'avoir donné la force et la patience pour accomplir ce travail. Mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette maîtrise. Je tiens à remercier mon professeur Guy Samson, directeur de ce mémoire, qui s'est toujours montré à l'écoute, ces conseils pertinents m'ont permis de mener à terme ce travail. Tous mes remerciements pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer, pour sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire. Je tiens aussi à remercier mes collègues au laboratoire de physiologie végétale ainsi que les personnes que j'ai rencontrées lors des recherches effectuées et qui ont accepté de répondre à mes questions avec gentillesse (Houcem, Ibtissem, et Jean François). Merci à toute l'équipe du laboratoire de biophysique (Imed et Hnia) sous la direction du professeur Robert Carpentier pour leur appui et leurs conseils. Enfin, je ne saurais achever sans remercier mon père pour l'incalculable aide qu'il m'a apportée, un grand merci à mon mari Hichem et à tous mes amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire. Merci à tous et à toutes.

## RÉSUMÉ

### Problématique et objectif principal

En milieu naturel, les plantes sont souvent soumises aux stress environnementaux tels que l'excès de lumière, sécheresse, froid, métaux lourds, pathogènes, etc. Ces stress environnementaux causent généralement une baisse de croissance résultant du même désordre physiologique : le stress oxydatif. Ce dernier se caractérise par une production excessive des radicaux libres par rapport à la capacité de détoxification. Dans ce cas, l'excès des radicaux libres (RL) entraîne de nombreux dégâts cellulaires (protéines, ADN, biomembranes).

Chez les plantes, le chloroplaste par ses activités photosynthétiques est le principal site de la production des RL. Lors de la photosynthèse, un ensemble de réactions photochimiques et biochimiques s'enchaînent. La première phase se caractérise par un transport d'électrons et de protons qui serviront à la synthèse d'ATP et de NADPH. Ces derniers seront utiles par la suite pour la réduction du CO<sub>2</sub> en sucre durant la phase biochimique. De nombreuses études ont montré les effets des stress environnementaux sur le transport photosynthétique d'électrons, mais relativement peu se sont intéressées à démontrer les effets négatifs des stress environnementaux sur la formation du gradient de pH.

Ce projet de maîtrise a été réalisé afin de mieux comprendre les différents effets inhibiteurs et découpleurs du stress oxydatif et de l'acide salicylique (AS) sur le transport d'électrons et le gradient de protons dans des thylacoïdes isolées d'épinard.

### Méthodologies

Pour répondre à nos objectifs de recherche, des thylacoïdes ont été isolés à partir de jeunes feuilles d'épinards (*Spinacia oleracea* L.). Ces thylacoïdes ont été traités ou non avec différentes concentrations a) du générateur de radicaux libres, le

dihydrochlorure de 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (AAPH) à 33°C pendant 20 min et b) d'AS pendant 15 min à 23 °C. Après les traitements, les efficacités photochimiques maximale ( $F_v/F_m$ ) et opérationnelle ( $\Delta F/F_m'$ ) du photosystème II ont été mesurées à partir de la fluorescence chlorophyllienne. La formation du  $\Delta pH$  et le taux de transport photosynthétique d'électrons (photoréduction du ferricyanure de potassium) induits par une lumière rouge de  $300 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ont été estimés simultanément à partir de la fluorescence du 9-aminoacridine (F9-AA) selon la méthode introduite par Evron et McCarty (2000). L'analyse cinétique des courbes de relaxation du quenching (atténuation) du F9-AA après la période d'illumination a permis d'estimer les effets des différents traitements sur la perméabilité des thylacoïdes vis-à-vis les protons.

## Résultats

Afin de démontrer l'efficacité de la méthode d'Evron et McCarty (2000), une première série de mesures préliminaires a d'abord été réalisée avec des composés dont les effets sont bien connus, soit l'inhibiteur du transport d'électrons (DCMU) et le découpleur ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Ces mesures nous ont montré que le DCMU, en bloquant le transport d'électrons photosynthétique, inhibe conséquemment le gradient de proton transmembranaire ( $\Delta pH$ ). De plus, le découpleur ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) inhibe la formation du  $\Delta pH$  en stimulant modérément le taux de transport d'électrons. L'effet découpleur du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a aussi été mis en évidence par l'accélération de la relaxation du quenching de la F9-AA suivant la période d'illumination, indiquant une diffusion plus rapide des protons à travers les thylacoïdes en présence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Dans notre deuxième série de mesures, les résultats ont montré que la formation des RL induites par l'AAPH a fortement inhibé le gradient transmembranaire de protons des thylacoïdes (concentration inhibant la réaction de 50 % ( $\text{IC}_{50}$ )  $\approx 1 \text{ mM}$ ). Fait intéressant, les rendements photochimiques maximums du PSII ( $F_v/F_m$ ) et opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ ) étaient moins sensibles que le  $\Delta pH$  avec des valeurs de  $\text{IC}_{50}$  environ 100 fois plus élevées ( $\text{IC}_{50} \approx 130 \text{ mM}$  pour  $F_v/F_m$  et  $\approx 80 \text{ mM}$  pour  $\Delta F/F_m'$ ).

La dernière partie de nos résultats avait le but de démontrer les effets de l'AS sur les thylacoïdes. Nos résultats montrent que l'AS agit à la fois comme découpleur et inhibiteur de la chaîne de transport d'électrons. Comme pour l'AAPH, l'AS affecte davantage la formation du  $\Delta pH$  ( $IC_{50} \approx 0,3 \text{ mM}$ ) que le transport d'électrons ( $IC_{50} \approx 2-3 \text{ mM}$  pour  $F_v/F_m$  et  $\Delta F/F_m'$ ).

## **Conclusion et implications**

Nos résultats démontrent que les radicaux libres générés par l'AAPH ainsi que l'AS inhibent plus fortement la formation du  $\Delta pH$  que le transport photosynthétique d'électrons. Une conséquence pratique de cette plus grande sensibilité du  $\Delta pH$  pourrait être que l'inhibition de la photosynthèse (taux d'assimilation de  $CO_2$ ) lors de stress environnementaux risque d'être sous-estimée en se basant que sur des mesures de taux de transport d'électrons ou de l'efficacité photochimique effective du PSII ( $\Delta F/F_m'$ ).

**Mots clés :** (9-AA) Fluorescence du 9-aminoacridine, (RL) radicaux libres, AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride), (AS) acide salicylique, ( $\Delta pH$ ) gradient de proton transmembranaire, (TE) transport d'électrons.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....</b>	<b>x</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Introduction et problématique générale .....	1
1.2 Stress oxydatif chez les plantes .....	4
1.3 Sites de formation des radicaux libres durant un stress.....	5
1.4 Détoxification des radicaux libres .....	6
1.5 Appareil photosynthétique.....	7
1.5.1 Aperçu de la photosynthèse .....	7
1.5.2 La localisation de la photosynthèse dans les plantes .....	8
1.5.3 Phases de la photosynthèse .....	10
1.6 La fluorescence chlorophyllienne.....	14
1.7 Rôle de l'acide salicylique dans l'acclimatation des plantes vis-à-vis les stress environnementaux et oxydatifs.....	15
1.8 Objectifs.....	16
1.9 Approche expérimentale.....	16
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>19</b>
2.1 Isolation des thylacoïdes.....	19
2.2 Traitements .....	20
2.2.1 Traitement AAPH .....	20
2.2.2 Traitement AS.....	20
2.3 Estimations de l'efficacité photochimique par la fluorescence de la Chl <i>a</i> .....	21
2.4 Estimations du gradient de protons et du taux de transport photosynthétique d'électrons par la fluorescence du 9-aminoacridine .....	21

**CHAPITRE III****RÉSULTATS..... 24**

- 3.1 Effet inhibiteur du DCMU et du découpleur  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur la fluorescence du 9-aminoacridine ..... 24
- 3.2 Effets des radicaux libres (AAPH) sur le transport d'électrons et le gradient de protons ..... 28
- 3.3 Effets de l'acide salicylique sur le transport d'électrons et le gradient de protons ..... 34

**CHAPITRE IV****DISCUSSION ET CONCLUSION..... 39**

- 4.1 Effet inhibiteur du DCMU et du découpleur  $\text{NH}_4\text{Cl}$  démontrés par leurs effets sur la fluorescence du 9-aminoacridine ..... 40
- 4.2 Effets des radicaux libres (AAPH) sur le transport d'électrons et le gradient de protons ..... 42
- 4.3 Effets de l'acide salicylique sur le transport d'électrons et le gradient de protons ..... 47
- 4.4 Possible rôle physiologique du découplage des thylacoïdes par les radicaux libres et l'acide salicylique ..... 50

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 52**



## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Sites de production des radicaux libres dans la cellule végétale .....	5
1.2	Production du superoxyde ( $O_2^-$ ) par le PSI (réaction de Mehler) suivie de sa dismutation en $H_2O_2$ .....	6
1.3	Cycle de détoxification du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène par le cycle Halliwell Asada .....	7
1.4	Interaction entre les phases photochimiques et biochimiques de la photosynthèse.....	8
1.5	Coupe longitudinale d'un chloroplaste.....	9
1.6	Processus de la photosynthèse .....	11
1.7	Fonctionnement du PSI dans la membrane thylacoïdale .....	12
1.8	Cycle de Calvin.....	14
1.9	Cinétique de la fluorescence du 9-aminoacridine (9-AA) permettant d'estimer simultanément le gradient de protons ( $\Delta pH$ ) et le taux de transport photosynthétique d'électrons selon la méthode de Evron et McCarty (2000).....	17
1.10	Spectres d'excitation (ext) et d'émission (ems) du 9-aminoacridine et spectre d'absorbance du ferricyanure de potassium (FeCN ou ici dénoté FeCy) (Evron et McCarty, 2000) .....	18
2.1	Cinétique de la fluorescence du 9-aminoacridine (F9-AA) permettant d'estimer simultanément le gradient de protons ( $\Delta pH$ ) et le taux de transport photosynthétique d'électrons (TE) selon la méthode d'Evron et McCarty (2000).....	23
3.1	Cinétiques de la fluorescence du 9-AA chez des thylacoïdes d'épinard : (a) contrôles et (b) traités avec $NH_4Cl$ (0,3 mM) et (c) traités avec DCMU (15 $\mu M$ ) .....	26
3.2	Inhibition du quenching de la fluorescence du 9-aminoacridine (Q9-AA) chez des thylacoïdes d'épinard traités avec différentes concentrations de $NH_4Cl$ .....	27

3.3	Valeurs moyennes du taux de transport d'électrons chez des thylacoïdes d'épinard en fonction de la concentration en $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	27
3.4	Courbes de relaxation de la fluorescence du 9-AA suivant la période d'illumination à $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mesurées chez des thylacoïdes contrôles (noir) et traités en présence de $0,3 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ (bleu). Courbes de relaxation du quenching de la fluorescence du 9-AA en unités relatives non-normalisées (a) et normalisées à 1 (b) .....	28
3.5	Valeurs moyennes du rendement photochimique maximal du PSII ( $F_v/F_m$ , ●) et du rendement photochimique opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ , ○) des thylacoïdes en fonction de [AAPH].....	30
3.6	Cinétique de la fluorescence du 9-AA chez des thylacoïdes d'épinard incubé à $33^\circ\text{C}$ après 20 min : (a) control et (b) traités avec AAPH [ $1 \text{ mM}$ ] .....	31
3.7	Inhibition du quenching de la fluorescence du 9-aminoacridine (Q9-AA) chez des thylacoïdes d'épinard traités avec différentes concentrations d'AAPH .....	32
3.8	Valeurs moyennes du taux de transport d'électrons chez des thylacoïdes d'épinard en fonction de la concentration en AAPH (entre 0 et $10 \text{ mM}$ ).....	32
3.9	Courbes de relaxation de la fluorescence du 9-AA suivant la période d'illumination à $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mesurées chez des thylacoïdes contrôles et traités en présence d'AAPH ( $1 \text{ mM}$ ) : (a) unité relative et (b) unité normalisée à 1 de fluorescence du 9-AA .....	33
3.10	Valeurs moyennes du rendement photochimique maximal du PSII ( $F_v/F_m$ ) et du rendement photochimique opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ ) des thylacoïdes en fonction de [AS].....	34
3.11	Cinétique de la fluorescence du 9-AA chez des thylacoïdes d'épinard à $23^\circ\text{C}$ après 15 min : (a) control et (b) traités avec AS [ $0,3 \text{ mM}$ ].....	36
3.12	Inhibition du quenching de la fluorescence du 9-aminoacridine (Q9-AA) chez des thylacoïdes d'épinard traités avec différentes concentrations d'AS .....	37
3.13	Valeurs moyennes du taux de transport d'électrons chez des thylacoïdes d'épinard en fonction de la concentration en AS.....	37
3.14	Courbes de relaxation de la fluorescence du 9-AA suivant la période d'illumination à $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mesurées chez des thylacoïdes contrôles et traités en présence d'AS ( $0,3 \text{ mM}$ ) : (a) unité relative et (b) unité normalisée à 1 de fluorescence du 9-AA .....	38

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

AS	Acide salicylique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-l,l-diméthylurée
FeCN	Ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$
Fm	Fluorescence chlorophyllienne maximale pour une feuille adaptée à l'obscurité
Fo	Fluorescence chlorophyllienne minimale
Fv/Fm	Rendement photochimique maximum du PSII
$\Delta F/F_m$	Rendement photochimique du PSII chez une plante adaptée à la lumière
GSH/GSSG	Glutathion réduit/oxydé
HEPES	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
OH <sup>-</sup>	Ion hydroxyde
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
P680	Centre réactionnel du PSII
P700	Centre réactionnel du PSI
q9-AA	Quenching de la fluorescence du 9-aminoacridine
RL	Radicaux libres
RUBISCO	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase
RUBP	Ribulose-1,5-biphosphate
SOD	Superoxyde dismutase
9AA	9-aminoacridine

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

#### 1.1 Introduction et problématique générale

En milieu naturel, les plantes sont souvent soumises aux stress environnementaux, c.-à-d. des conditions défavorables de l'environnement diminuant leur croissance et leur fitness. Ces stress sont causés par divers facteurs abiotiques et biotiques tels que l'excès de lumière, la sécheresse, les températures extrêmes, les métaux lourds, les pathogènes et les herbivores, etc. Malgré la diversité de ces facteurs de stress, leurs effets négatifs chez les végétaux résultent généralement d'un même désordre physiologique : le stress oxydatif. Ce dernier se caractérise par une production excessive dans la plante de radicaux libres, c.-à-d. des molécules hautement réactives dues à la présence d'un électron non apparié sur leur orbitale externe (Halliwell et Gutteridge, 2007). Ces radicaux libres interagissent avec les composantes cellulaires telles que les enzymes, les membranes, les protéines et l'ADN causant ainsi des dommages importants au niveau des cellules et de l'organisme (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Dhalla et Temsah, 2000).

L'un des principaux sites de la production des radicaux libres (RL) chez les plantes est le chloroplaste, l'organe où se déroulent les diverses réactions de la photosynthèse. Ceci s'explique d'une part, par les forts potentiels d'oxydo-réduction générés par le transport photosynthétique d'électrons et d'autre part, par l'augmentation de la concentration d'oxygène généré au niveau du photosystème II (PSII) (Valko *et al.*, 2006). Plus spécifiquement, la formation des RL se réalise surtout au niveau du photosystème I lors de la réaction de Mehler.

Le chloroplaste étant le principal site de production des RL, les effets toxiques de ces derniers affecteront en premier lieu la photosynthèse qui est particulièrement sensible à leurs effets toxiques. La photosynthèse peut être décomposée en deux phases

complémentaires se produisant simultanément dans le chloroplaste, les phases photochimiques et biochimiques. La première se produit principalement dans les thylacoïdes, et se caractérise par un transport d'électrons ayant l'eau comme donneur primaire d'électrons au niveau du PSII et le  $\text{NADP}^+$  comme accepteur terminal d'électrons au niveau du PSI. En plus de générer de l' $\text{O}_2$  et le NADPH, ce transport d'électrons permet l'établissement d'un gradient de protons, dont l'énergie sera utilisée lors de la photophosphorylation pour la production d'ATP. Les molécules de NADPH et d'ATP doivent être produites dans une proportion bien déterminée (1,5 ATP pour 1 NADPH) pour assurer le bon fonctionnement du cycle de Calvin ayant lieu dans le stroma des chloroplastes. Tandis que de nombreuses études ont montré les effets des stress environnementaux sur le transport photosynthétique d'électrons, il est surprenant de constater qu'aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée à démontrer les effets négatifs des stress environnementaux sur la formation du gradient de pH, pourtant il est aussi indispensable pour le bon fonctionnement de la phase biochimique de la photosynthèse.

La formation du gradient de pH à travers la membrane des thylakoïdes est donc un paramètre fondamental de la photosynthèse, qui elle dépend non seulement du degré d'intégrité du transport d'électrons, mais aussi de ce potentiel électrochimique. En effet, la dissipation du gradient de protons fournit l'énergie nécessaire à la formation d'ATP (Taiz et Zeiger, 2002; Nobel, 1999). De plus, l'acidification du lumen augmente la concentration en  $\text{Mg}^{2+}$  ainsi que l'augmentation du pH dans le stroma. Ces deux conditions (pH alcalin et enrichissement en  $\text{Mg}^{2+}$  dans le stroma) sont essentielles à l'activation de l'enzyme Rubisco (ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase), enzyme clé dans le cycle de Calvin (Lorimer *et al.*, 1976; Portis, 1992). Il est donc intéressant de vérifier dans mon projet de maîtrise les effets inhibiteurs du stress oxydatif et de l'acide salicylique sur la photosynthèse. De plus, il s'avère intéressant de démontrer l'effet des RL générés par 2,2'-Azobis 2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH), un composé chimique soluble dans l'eau qui est largement utilisé en tant que générateur de radicaux libres, sur l'efficacité des réactions photochimiques primaires du (PSII) et de vérifier la sensibilité du gradient de proton transmembranaire aux RL.

Face aux conditions adverses de l'environnement, les plantes ne restent pas passives et tentent de s'acclimater. Dans la majorité des cas, cette acclimatation est initiée par des molécules signal (phytohormones) telles que les acides abscissique, jasmonique et salicylique. Parmi ces phytohormones, l'acide salicylique (AS) est particulièrement intéressant en raison de ses applications pratiques. En effet, plusieurs études ont démontré que l'application exogène de l'AS atténue les effets inhibiteurs de différents stress environnementaux tels que les métaux lourds, la salinité, les UVs, la sécheresse, l'ozone, etc.) (revue par Hayat *et al.*, 2010). Ces effets protecteurs peuvent être corrélés à la stimulation par l'AS de la capacité antioxydante des végétaux en conditions de stress, impliquant soit des stimulations du complexe enzymatique, ainsi que l'augmentation de la concentration des composés phénoliques dans les plantes (Bechtold *et al.*, 2005).

Malgré ses effets bénéfiques, l'AS a un effet néfaste à des concentrations élevées menant à une inhibition de croissance des végétaux (Hayat, 2010). Un examen de la littérature me permet d'émettre l'hypothèse que cet effet inhibiteur de l'AS résulterait en partie du moins de son effet découpleur inhibant la formation du gradient de pH et ainsi, la production d'ATP essentielle à l'assimilation de CO<sub>2</sub>. En effet, Gordon *et al.* (2004) ont révélé que l'AS induit une inhibition de la phosphorylation oxydative en favorisant la thermogénèse dans des racines de blé. De plus, Norman *et al.* (2004) ont montré que l'application exogène de cette molécule-signal dans les mitochondries de tabac peut agir comme découpleur, et à des concentrations élevées comme inhibiteur de transport respiratoire d'électrons. Il est étonnant de constater que notre revue de littérature n'a identifié aucune étude ayant démontré l'effet découpleur de l'AS dans les chloroplastes.

Considérant d'une part l'importance vitale de la formation du gradient de protons pour la photosynthèse, et d'autre part l'absence de connaissance quant à la susceptibilité du gradient de protons vis-à-vis le stress oxydatif généré par différents facteurs environnementaux ainsi que l'AS est principalement impliqué dans l'acclimatation des végétaux face à des conditions de stress oxydatifs, je propose donc dans ce mémoire de caractériser les effets inhibiteurs des radicaux libres et de l'acide salicylique sur le

gradient transmembranaire de protons ainsi que sur le transport photosynthétique d'électrons. Pour atteindre ces objectifs, ce projet de maîtrise a utilisé une approche originale. Tout d'abord, pour caractériser les effets des RL, j'ai testé pour la première fois sur les thylacoïdes les effets inhibiteurs du 2,2'-Azobis 2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH). Ce composé chimique soluble dans l'eau est largement utilisé en tant que générateur de radicaux libres, notamment dans les méthodes d'estimations de la capacité antioxydante (tests ORAC). L'AAPH produit un radical libre peroxy ( $\text{ROO}\bullet$ ) en se décomposant à un taux constant en fonction de la chaleur (Crichton *et al.* 2002). Autre aspect original de ma maîtrise, nous avons appliqué pour la première fois à notre connaissance la méthode introduite par Evron et McCarty (2000) combinant l'indicateur de  $\Delta\text{pH}$  9-aminoacridine et l'accepteur d'électrons ferricyanure ( $\text{FeCN}$ ) pour mesurer les effets inhibiteurs (AAPH ou AS) simultanément sur le gradient de protons et sur le transport photosynthétique d'électrons. Mes résultats démontrent que la formation du gradient de protons est nettement plus sensible que le transport d'électrons dans les thylacoïdes vis-à-vis les radicaux libres générés par l'AAPH et vis-à-vis l'AS.

## 1.2 Stress oxydatif chez les plantes

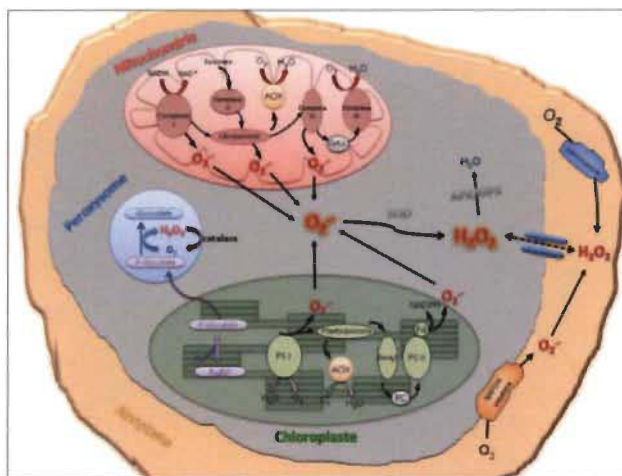
Partout où elles se développent, les plantes sont soumises à différentes contraintes résultant en une inhibition de croissance. Ces stress sont causés par divers facteurs biotiques (insectes, bactéries, virus) et abiotiques (sécheresse, forte lumière, les températures extrêmes, métaux lourds). Malgré la diversité de ces facteurs de stress, leurs effets négatifs chez les plantes résultent généralement d'un même désordre métabolique : le stress oxydatif. Ce dernier est dû à la teneur élevée des radicaux libres qui sont depuis longtemps reconnus pour leur importance dans la réponse des plantes aux contraintes environnementales. Il existe deux types de radicaux libres, les radicaux dérivés d'oxygène (ROS) et les radicaux dérivés d'azote (RNS). Les RL représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants (Valko *et al.*, 2004). Ce sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un électron non apparié sur leurs orbitales externes (Halliwell et Gutteridge, 1999). Ces RL peuvent provoquer des dommages importants dans la structure et le métabolisme

cellulaire en dégradant les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Cadenas et Davies, 2000, Paincemail *et al.*, 1999).

### 1.3 Sites de formation des radicaux libres durant un stress

Dans la plupart du temps, la plante peut produire les RL en faible quantité dus, par exemple, à l'augmentation du taux de sucre (glucose), de la respiration ou un excès du transport d'électrons. Lors d'un stress oxydatif, l'accumulation phytotoxique de ces différents radicaux oxygénés peut causer plusieurs dommages, conduisant à la perte de l'intégrité membranaire, la sénescence, la destruction de la chlorophylle et à la diminution de la photosynthèse chez les cellules végétales (Vichnevetskaia et Roy, 1999).

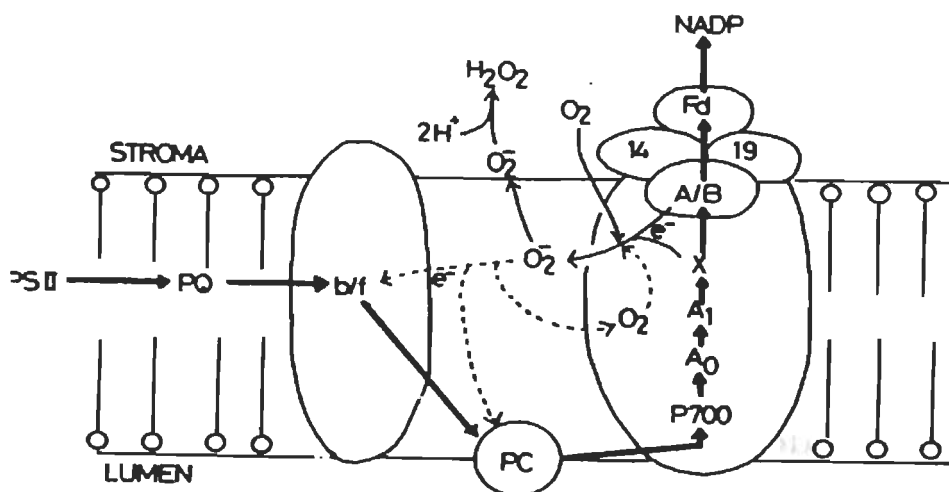
Chez les plantes, il existe plusieurs sources de production de RL : chloroplaste, mitochondrie, cytoplasme, la photorespiration dans les peroxysomes et la membrane plasmique (Mittler, 2002; Parent *et al.*, 2008) (Figure 1.1). De nombreuses situations de stress peuvent induire une inhibition du transport d'électrons photosynthétiques dans le chloroplaste, altérant ainsi les réactions photochimiques aux centres réactionnels des PSII et PSI.



**Figure 1.1** Sites de production des radicaux libres dans la cellule végétale (Parent *et al.*, 2008).



Dans la plupart des stress environnementaux, le PSI et le PSII représentent une source importante de production des RL (Nishiyama *et al.*, 2006). D'une part, au niveau du PSI, il est déjà connu que les électrons provenant de la photolyse d'eau réagissent avec l'oxygène ( $O_2$ ), la réduction de l' $O_2$  aboutit à la formation de superoxyde ( $O_2^-$ ) (réaction de Mehler), qui sera ensuite transformé en  $H_2O_2$  par une réaction de dismutation (Valko *et al.*, 2004) en présence de l'enzyme SOD (superoxyde dismutase) qui accélère cette réaction dans les systèmes biologiques (Michiels *et al.*, 1994) (Figure 1.2). D'autre part, la production d'oxygène singulet par le PSII se forme le plus souvent à de fortes intensités lumineuses, ou lors d'une inhibition du transport d'électrons par différents polluants. La formation des RL par le PSII se produit habituellement pendant la photolyse de l'eau (Niyogi, 1999).

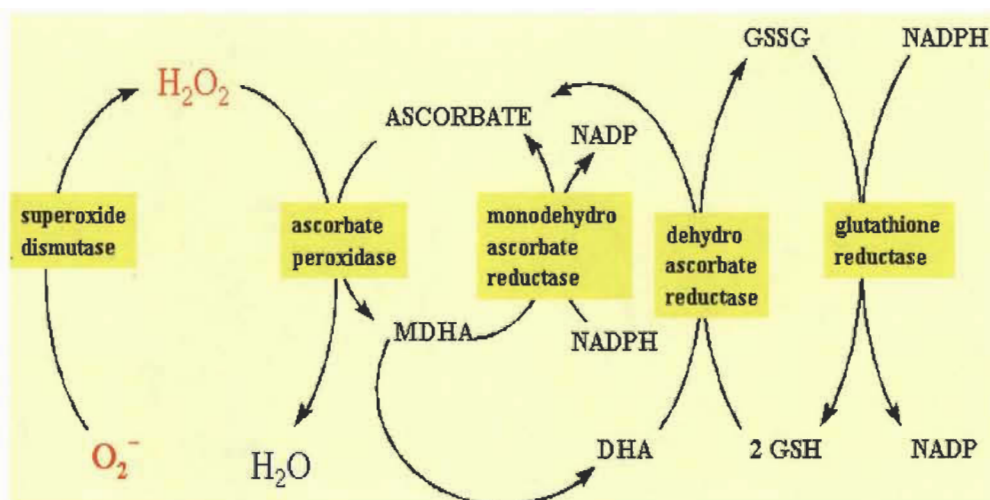


**Figure 1.2** Production du superoxyde ( $O_2^-$ ) par le PSI (réaction de Mehler) suivie de sa dismutation en  $H_2O_2$ .

#### 1.4 Détoxification des radicaux libres

À l'état physiologique normal, il existe un équilibre entre la production des radicaux libres et les antioxydants. Cependant, lors d'un stress oxydatif la génération des radicaux libres dépasse celle des antioxydants, ce qui peut entraîner à de fortes doses la mort cellulaire. La plante dispose des systèmes de protection qui lui permettent de lutter contre ces espèces radicalaires qui reposent en majeure partie sur le cycle Halliwell-

Asada (Badenhorst *et al.*, 1998). Cette défense s'effectue dans les chloroplastes, directement au site de production des radicaux libres. Le cycle Halliwell-Asada est une série de réactions d'oxydoréduction : le superoxyde dismutase (SOD) transforme l'ion superoxyde  $O_2^-$  en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), molécule moins toxique pour la cellule. Par la suite, l'ascorbate peroxydase pourra décomposer le  $H_2O_2$  en eau et en oxygène. L'ascorbate oxydé sera régénéré par une série de réactions utilisant le glutathion et NADPH (Davey *et al.*, 2000) (Figure 1.3).



**Figure 1.3** Cycle de détoxification du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène par le cycle Halliwell Asada (Davey *et al.*, 2000).

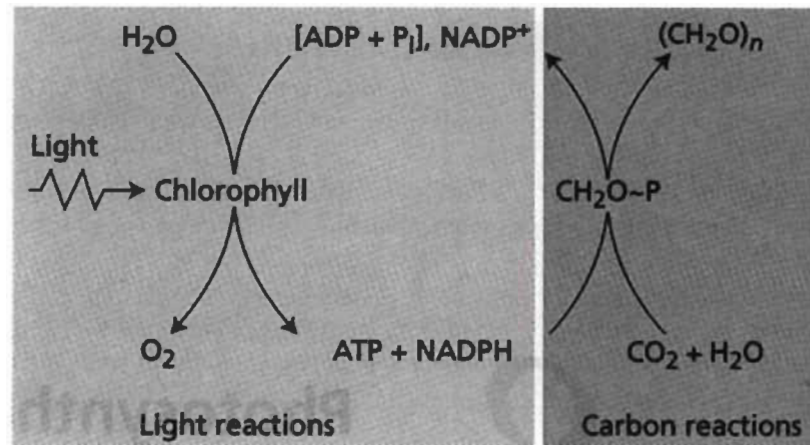
## 1.5 Appareil photosynthétique

### 1.5.1 Aperçu de la photosynthèse

La photosynthèse est le processus par lequel les végétaux capturent l'énergie de la lumière solaire pour synthétiser des glucides ( $C_6H_{12}O_6$ ) à partir du  $CO_2$  et de l'eau. Ce processus est rendu possible grâce à l'ensemble des réactions produisant le pouvoir réducteur (NADPH) et une source d'énergie (ATP) issue, à la base, de la photolyse de l'eau (Figure 1.4). La photosynthèse se résume généralement par l'équation suivante (Whitmarsh et Govindjee, 1999).



Dans cette équation globale, les 24 électrons retirés lors de la photolyse de l'eau sont utilisés pour réduire 6 CO<sub>2</sub> en une molécule d'hexose.



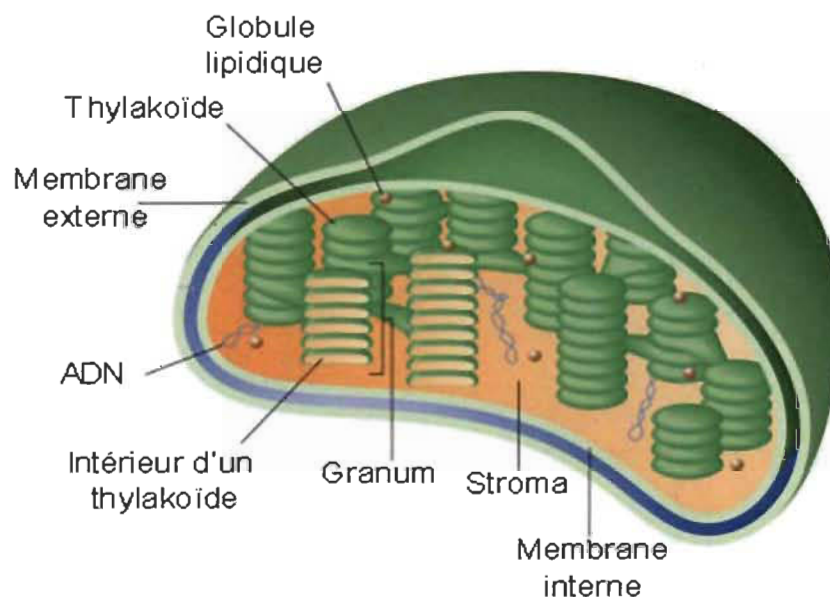
**Figure 1.4** Interaction entre les phases photochimiques et biochimiques de la photosynthèse (Taiz et Zeiger, 2006).

## 1.5.2 La localisation de la photosynthèse dans les plantes

### 1.5.2.1 Les chloroplastes

Les phases photochimiques et biochimiques de la photosynthèse se déroulent dans le chloroplaste (Figure 1.5) qui est délimité du cytoplasme par une enveloppe formée d'une double membrane. La structure interne du chloroplaste est le système membranaire connue sous le nom membranes thylacoïdales, plus brièvement thylacoïdes, qui comprend des complexes de pigments-protéines effectuant les réactions photochimiques de la photosynthèse (Dekker et Boekema, 2005). Les thylacoïdes sont constitués d'un ensemble de vésicules aplaties (les lamelles) qui sont empilées pour former les granas. Les granas sont ensuite reliés entre eux par des thylacoïdes simples non empilés, désignés par lamelles stromatiques (Mustardy et Garab, 2003). L'espace présent à l'intérieur du thylacoïde est désigné par lumen. On distingue dans les membranes du thylacoïde différents complexes de pigments-protéines qui participent aux réactions photochimiques et au transport des électrons photosynthétiques (Malkin et Niyogi, 2000, Dekker et Boekema, 2005) : (i) Les antennes collectrices de lumière (Light Harvesting Complexes : LHCI et LHCII) formées de pigments photosynthétiques

liés à des protéines membranaires. (ii) Les centres réactionnels du PSII et du PSI, vers lesquels l'énergie lumineuse (absorbée par les LHCII et LHCI) est transférée pour effectuer les réactions photochimiques primaires. (iii) Une chaîne de transporteurs d'électrons situés entre le PSII et PSI, composés de plastoquinones (PQ), du complexe cytochrome  $b_6f$  et de plastocyanines (PC). (iv) Le système enzymatique d'ATP synthétase qui catalyse la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique en utilisant l'énergie libérée lors de la dissipation du gradient transmembranaire de protons. Ces complexes de pigments-protéines ne sont pas distribués uniformément dans les membranes des thylacoïdes. En effet, les complexes du PSII et leurs antennes collectrices de lumière se situent en majorité dans le grana, tandis que, les PSI, leurs antennes collectrices de lumière et l'ATP synthétase se situent dans les lamelles stromatiques et les régions marginales des granas (Allen et Forsberg, 2001).



**Figure 1.5** Coupe longitudinale d'un chloroplaste (<http://www.vscht.cz>).

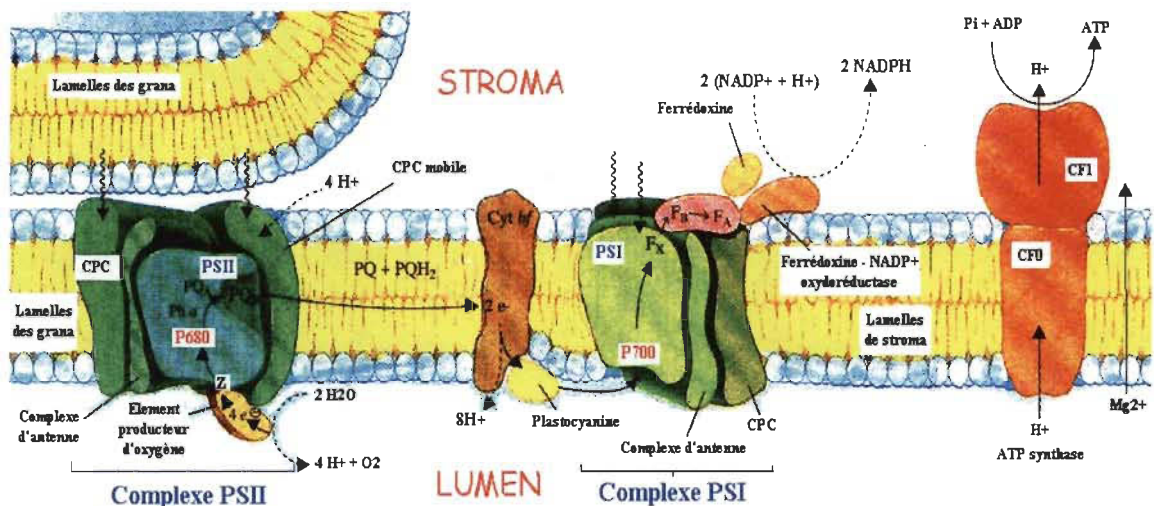
### 1.5.3 Phases de la photosynthèse

#### 1.5.3.1 *Les réactions photochimiques et le transport d'électrons*

La lumière est vitale aux végétaux puisque sa transformation en énergie photochimique permet de générer le transport d'électrons et de protons qui résulteront en la synthèse de molécules énergétiques (ATP et NADPH) permettant de réduire le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) en carbone organique (glucide) lors de la phase biochimique de la photosynthèse. Tout d'abord, les photons sont absorbés par les pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes chez les algues vertes et les plantes supérieures) présents dans les antennes collectrices (Figure 1.6). La majeure partie de l'énergie lumineuse absorbée sera transférée sous forme d'excitons aux centres réactionnels des PSI et PSII pour être utilisée dans les réactions photochimiques primaires. Au cours de son transfert vers les centres réactionnels, une fraction de l'énergie d'excitation sera perdue et réémise sous forme de chaleur ou de fluorescence. Dans les antennes du PSII, l'énergie d'excitation est canalisée vers la chlorophylle  $\alpha$  spéciale dénotée P680 au niveau du centre réactionnel. Son excitation provoque une réaction photochimique primaire, c.-à-d. la photooxydation de P680 en  $\text{P680}^+$ , et la réduction de l'accepteur primaire d'électron, la phéophytine (Phéo). Cette séparation de charges ( $\text{P680}^+\text{Phéo}^-$ ) initie un transfert d'électrons par lequel  $\text{P680}^+$  regagne un électron en oxydant (photolyse) une molécule d'eau via la tyroline Z au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. Pendant ce temps, la  $\text{Phéo}^-$  cèdera son électron aux accepteurs plastoquinones  $\text{Q}_A$  et  $\text{Q}_B$ . La  $\text{Q}_B$ , après avoir accepté deux électrons et pris deux protons du stroma, se détache de son site et migre dans les membranes internes des chloroplastes (les thylacoïdes) vers les complexes du cytochrome  $\text{b}_6\text{f}$  où elle sera oxydée. L'électron est ensuite transféré via la plastocyanine vers le centre réactionnel du PSI. Grâce à cet électron et à un photon provenant de l'antenne du PSI, un électron du centre réactionnel du PSI chemine jusqu'à la ferrédoxine, une protéine présente dans le stroma qui réduira le  $\text{NADP}^+$  en NADPH à l'aide d'une enzyme. En plus de produire le NADPH, le transport photosynthétique d'électrons génère un gradient de protons ( $\Delta\text{pH}$ ) qui s'accumulent dans le lumen des thylacoïdes suite à la photolyse de l'eau (en  $\text{H}^+$  et  $\text{O}_2$ ) et lors de l'oxydation des plastoquinones au niveau du cytochrome  $\text{b}_6\text{f}$ . L'énergie de ce



$\Delta pH$  est dissipée par le facteur de couplage (F-ATPase ou ATP synthase) pour produire des molécules d'ATP. Les molécules de NADPH et d'ATP sont ensuite utilisées comme source d'énergie par le cycle de Calvin afin de réduire le  $CO_2$  en glucides lors de la phase biochimique de la photosynthèse (Melis, 1999). Ainsi, la phase biochimique de la photosynthèse est dépendante de la phase photochimique qui lui fournit les molécules de NADPH et d'ATP, tandis que la phase photochimique est dépendante de la phase biochimique qui régénère le  $NADP^+$ , l'ADP et le phosphate inorganique, essentiels au maintien du transport photosynthétique d'électrons (Chen *et al.*, 1992).



**Figure 1.6** Processus de la photosynthèse (Horton *et al.*, 1994).

### a) Le photosystème II (PSII)

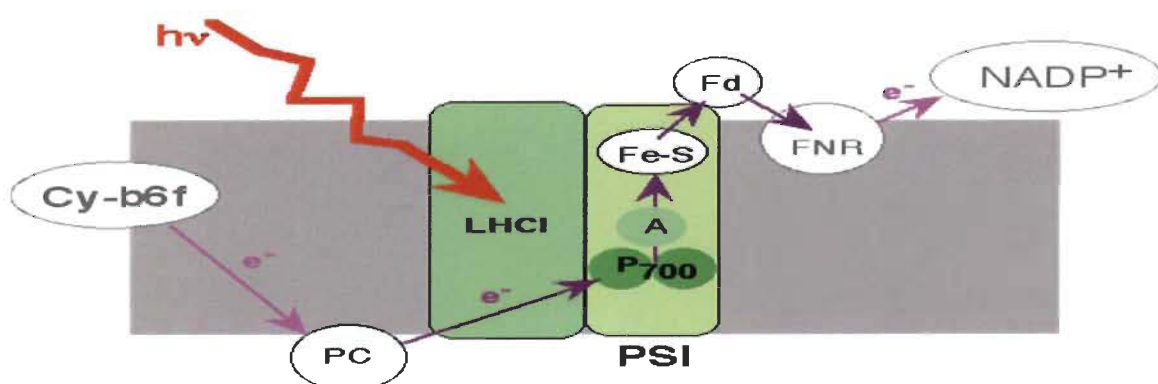
Le PSII est un complexe multiprotéiques, qui utilise l'énergie lumineuse pour oxyder l'eau et réduire les plastoquinones (PQ). Les deux réactions ont lieu dans le lumen et le stroma. Lorsque l'énergie d'excitation atteint le centre réactionnel du PSII, il peut se produire une séparation de charge où la chlorophylle spéciale P680 éjecte un électron qui passe à une phéophytine, qui le transfère à une plastoquinone (PQ) fixe ( $Q_A$ ). Cette dernière cède son électron à une autre quinone  $Q_B$  (côté accepteur). Après avoir accepté deux électrons et deux protons, la plastoquinole ( $PQH_2$ ) se libère et migre vers le complexe Cyt  $b_6f$  pour être oxydée. (Nield, 1997).

### b) Le cytochrome $b_6f$

Le cytochrome  $b_6f$  est un complexe trimérique (Whitelegge *et al.* 2002). Globalement, il agit comme une plastoquinone-plastocyanine oxydoréductase. Il assure le transfert d'électrons entre les deux photosystèmes (PSII et PSI), en acceptant les électrons des plastoquinones (en provenance des PSII) et en réduisant les plastocyanines (en route vers le PSI). L'oxydation des plastoquinones permet de larguer les protons  $H^+$  dans le lumen des chloroplastes à travers les thylacoïdes pour produire l'ATP (Kurusu *et al.*, 2003). Le transport cyclique « Q-cycle » au sein du complexe Cyt  $b_6f$  permet de transporter plus de protons vers le lumen et ainsi aider à produire plus d'ATP.

### c) Le photosystème I (PSI)

En plus du PSII, le PSI est le site où s'effectue l'autre réaction photochimique primaire (Figure 1.7). Globalement, il agit comme une plastocyanine ferrédoxine oxydoréductase dans les membranes des thylacoïdes. Les complexes collecteurs de lumière de l'antenne interne du PSI absorbent les photons et transfèrent l'énergie d'excitation à P700, le donneur d'électrons primaires. La séparation de charges ultérieures et le transport des électrons conduisent à la réduction de la ferrédoxine via différentes composantes redox (complexe Fe-S, vit K, A, B). Les protéines du PSI sont responsables de l'arrangement précis des cofacteurs et de déterminer les propriétés redox des centres de transfert d'électrons.



**Figure 1.7** Fonctionnement du PSI dans la membrane thylacoïdale ([www.snv.jussieu.fr](http://www.snv.jussieu.fr)).

#### **d) Transport cyclique des électrons autour du PSI**

Selon la disponibilité de  $\text{NADP}^+$  et les besoins métaboliques des cellules, la ferrédoxine peut réduire les molécules de PQ au niveau du complexe Cyt  $b_6f$  pour former le transport cyclique d'électrons. Un tel transport permet de pomper plus de protons dans le lumen des thylacoïdes et ainsi former plus d'ATP. Le transport cyclique d'électrons augmente donc la proportion d'ATP par rapport au NADPH (Taiz et Zeiger, 2002).

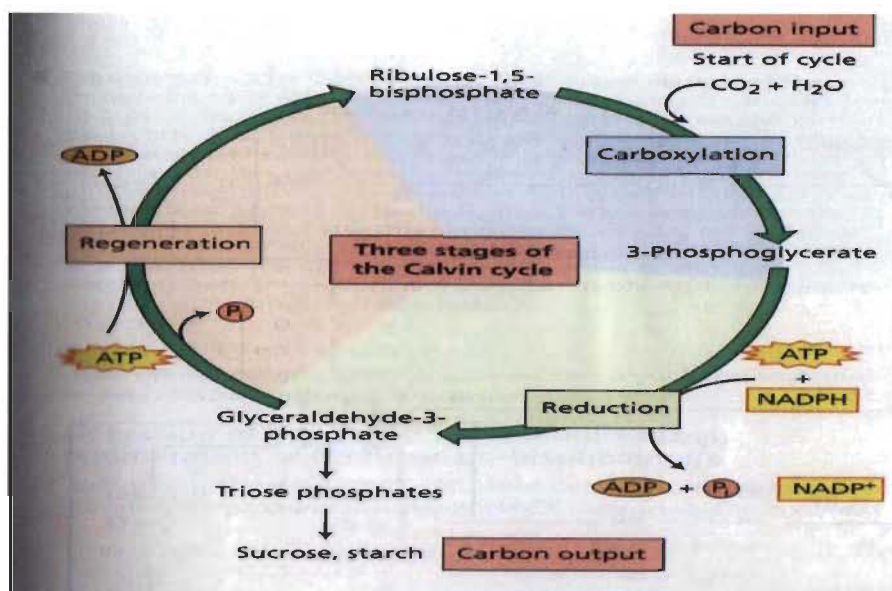
#### **e) Gradient de protons transmembranaire et photophosphorylation**

Le transport d'électrons généré par les réactions photochimiques au sein des PSII et PSI induit la formation d'un gradient transmembranaire de protons entre le stroma et le lumen du thylacoïde via la plastoquinone et le cytochrome  $b_6f$ . La réaction de photolyse de l'eau catalysée par le complexe de dégagement d'oxygène du PSII contribue également au gradient transmembranaire de protons. La dissipation de l'énergie contenue dans ce gradient de protons au niveau de l'ATP synthétase induit la synthèse d'ATP lors du processus de photophosphorylation (Taiz et Zeiger, 2002).

#### **1.5.3.2 Phase biochimique de la photosynthèse**

Le cycle de Calvin constitue une série de réactions biochimiques pouvant être décomposée en trois phases : carboxylation, réduction et régénération (Malkin et Niyogi, 2000). Durant la phase de carboxylation, le  $\text{CO}_2$  et l'eau sont combinés enzymatiquement, par le RUBISCO, à un sucre à 5 carbones qui est le ribulose-1-5-biphosphate (RuBP), pour former 2 molécules de 3 carbones, le 3-phosphoglycérate (3-PGA). Au cours de la phase de réduction, le 3-PGA est réduit en triose-phosphate (glycéraldéhyde 3-phosphate) par le NADPH et l'ATP (Figure 1.8). A la fin et durant la phase de régénération, la majeure partie des trioses-P (5/6) est utilisée à la resynthèse du RuBP à l'aide de l'ATP permettant de recommencer le cycle, l'autre partie (1/6) allant à la synthèse d'amidon et/ou de saccharose (sucrose) (Taiz et Zeiger, 2006).





**Figure 1.8** Cycle de Calvin (Taiz et Zeiger, 2006).

## 1.6 La fluorescence chlorophyllienne

La lumière absorbée par l'appareil photosynthétique n'est pas totalement transformée en énergie chimique. Une partie est perdue sous forme de chaleur et de fluorescence. À température ordinaire, l'émission de la fluorescence chlorophyllienne provient essentiellement de l'antenne collectrice du PSII. L'émission de la fluorescence par le PSI est faible comparativement et ne représente au plus que 10 à 20 % de l'émission totale. De plus, l'émission de fluorescence venant du PSII est variable tandis que celle qui vient du PSI ne l'est pas (Krause et Weis, 1984; Maxwell et Johnson, 2000). Chez une feuille adaptée à l'obscurité lorsque  $Q_A$  est oxydé dans tous les PSII, c.-à-d. que tous les centres réactionnels sont ouverts, l'efficacité photochimique est maximale et l'intensité de la fluorescence est minimale et est dénotée  $F_0$  (seulement 1 % de l'énergie perdue en fluorescence). Si l'on applique un flash lumineux saturant de 1 s, tous les  $Q_A$  sont momentanément réduits (centres réactionnels fermés), l'efficacité photochimique est minimale et donc la fluorescence est maximale ( $F_m$ ). Chez une feuille exposée à une intensité lumineuse quelconque, le  $Q_A$  est réduit dans une fraction des PSII d'où une augmentation de l'intensité de la fluorescence ( $F$  ou  $F_s$ ). En même temps, le transport d'électrons dans les thylacoïdes cause la formation d'un  $\Delta pH$ , qui lui entraîne

l'accumulation de zéaxanthine. Ce dernier entraîne une plus grande dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. C'est pourquoi lorsqu'on applique un flash lumineux saturant causant la fermeture momentanée de tous les centres réactionnels, la fluorescence maximale ( $F_m'$ ) pour ces conditions est inférieure à  $F_m$  (à cause de la plus grande dissipation de l'énergie sous forme de chaleur en présence de zéaxanthine) (Genty *et al.*, 1989).

### **1.7 Rôle de l'acide salicylique dans l'acclimatation des plantes vis-à-vis les stress environnementaux et oxydatifs**

Les conditions environnementales dans lesquelles les plantes se développent varient de façon constante durant la journée, les saisons ou selon le climat. Ces variations de l'environnement sont causées par divers facteurs abiotiques et biotiques tels que l'excès de lumière, la sécheresse, les températures extrêmes, les métaux lourds, les pathogènes et les herbivores, etc. Leurs effets négatifs chez les plantes résultent généralement d'un même désordre physiologique : le stress oxydatif. Ce dernier peut toucher la photosynthèse. Cependant, les plantes réagissent de façon appropriée selon la nature et l'intensité de ces stress en mettant en jeu des réponses spécifiques qui leur permettent de s'acclimater. Dans la majorité des cas, l'acclimatation des plantes repose sur des molécules signal (phytohormones) telles que les acides abscissique, jasmonique et salicylique (AS). Il a été trouvé que l'AS est particulièrement intéressant en raison de ses applications potentielles. En effet, plusieurs études ont démontré que l'application exogène de l'AS atténue les effets inhibiteurs de différents stress environnementaux tels que les métaux lourds, la salinité, les UVs, la sécheresse, l'ozone, etc. (revue par Hayat *et al.*, 2010). Une autre étude a révélé que l'addition d'AS a réduit l'excès de la toxicité causé par le manganèse et a stimulé la croissance chez des plantes de concombre (Shi et Zhu, 2007). L'application exogène de l'AS augmente la concentration des composés phénoliques dans les plantes (Bechtold *et al.*, 2005) et stimule le complexe antioxydant acide ascorbique GSH (Chao *et al.*, 2010). Aussi, l'AS améliore les activités des enzymes antioxydantes, la peroxydase (POX) et le superoxyde dismutase (SOD) (revue Hayat *et al.*, 2010).

Cependant, l'AS peut avoir des effets néfastes à des concentrations élevées menant à une inhibition de croissance des végétaux (Shakirova, 2007; Hayat, 2010). Sahu *et al.* (2002) ont cultivé des plantes de blé (*Triticum aestivum*) avec trois différentes concentrations d'acide salicylique (50, 500 et 1000  $\mu\text{M}$ ) pendant sept jours. Les résultats ont montré que l'AS à de faibles concentrations favorise l'activité photosynthétique et stimule le transport d'électrons tandis qu'à de fortes concentrations il induit une atténuation drastique de l'activité photosynthétique. Aussi, Janda *et al.* (2012) ont montré que l'AS inhibe également la photosynthèse chez des feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum*) via la fermeture des stomates et en ralentissant également le transport d'électrons du PS II. De plus Gordon *et al.* (2004), ont démontré que l'AS induit une inhibition de la phosphorylation oxydative en favorisant la thermogénèse dans des racines de blé. D'autres études ont confirmé que l'AS s'est avéré inhibiteur du taux de transport d'électrons à des concentrations croissantes (Poor *et al.*, 2010, Norman *et al.*, 2004; Xie et Chen, 1999; Hayat, 2010).

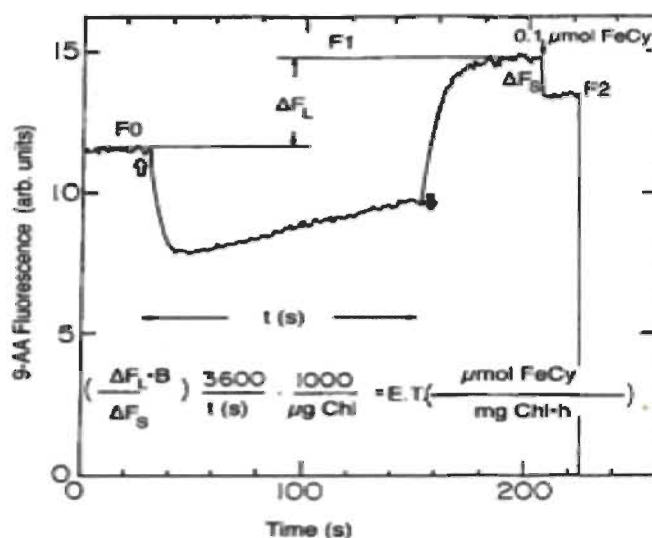
## 1.8 Objectifs

Considérant l'importance vitale du transport d'électron et la formation du gradient de protons pour la photosynthèse, je propose dans ce mémoire de caractériser les effets inhibiteurs des radicaux libres et de l'acide salicylique sur le gradient transmembranaire de protons ainsi que sur le transport photosynthétique d'électrons sur des thylacoïdes isolés à partir des feuilles d'épinard.

## 1.9 Approche expérimentale

Le transport d'électrons et le gradient de protons à travers la membrane des thylacoïdes sont deux paramètres fondamentaux de la photosynthèse. Dans ce mémoire de maîtrise, nous avons voulu caractériser et comparer les effets inhibiteurs et découpleurs causés par les radicaux libres générés par l'AAPH et ceux causés par l'acide salicylique. Nous avons donc mesuré les effets de ces composés sur les fonctions des thylacoïdes, spécifiquement, sur le transport photosynthétique d'électrons et le gradient transmembranaire de protons.

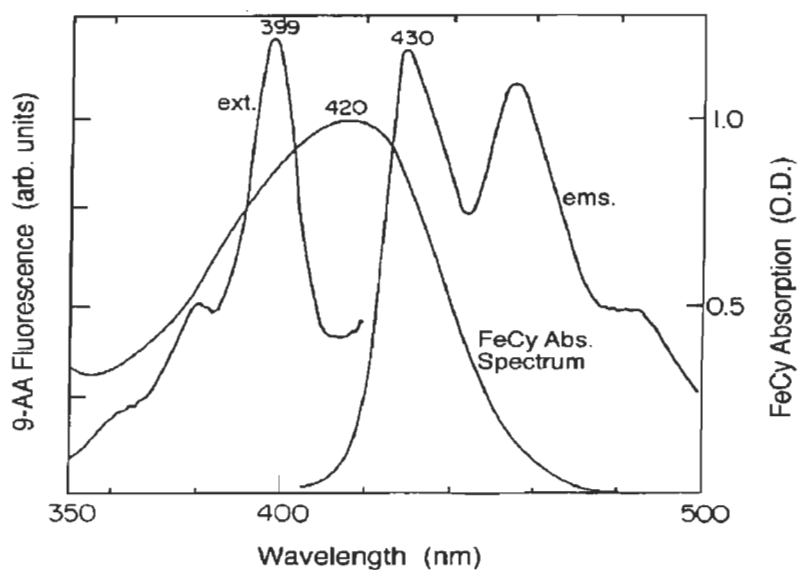
Tel que mentionné précédemment, un aspect original de ce mémoire est l'application pour la première fois à notre connaissance de la méthode Evron et McCarty (2000) pour mesurer simultanément les effets inhibiteurs et découpleurs causés par l'AAPH et l'acide salicylique. Cette méthode repose sur l'utilisation combinée de l'indicateur de  $\Delta\text{pH}$  9-aminoacridine (9-AA) et de l'accepteur d'électrons ferricyanure (FeCN). Tel que présenté à la figure 1.10, le spectre d'absorbance du FeCN (maximum d'absorbance à 420 nm) chevauche significativement celui du 9-AA (maximum d'absorbance à 399 nm). La perte d'absorbance du FeCN lors de sa photoréduction au niveau du PSI cause donc une hausse de l'excitation du 9-AA et par conséquent une augmentation de la fluorescence du 9-AA (F9-AA). L'augmentation de la F9-AA durant l'illumination dénotée  $\Delta F_L$  dans la figure 1.9 peut être reliée à la quantité de FeCN photoréduit durant l'illumination en mesurant la baisse de F9-AA suite à l'addition d'une quantité connue de FeCN ( $\Delta F_S$  dans la figure 1.9).



**Figure 1.9** Cinétique de la fluorescence du 9-aminoacridine (9-AA) permettant d'estimer simultanément le gradient de protons ( $\Delta\text{pH}$ ) et le taux de transport photosynthétique d'électrons selon la méthode de Evron et McCarty (2000).

La fluorescence du 9-AA diminue rapidement au début de la période d'illumination (large flèche blanche) du à la formation du  $\Delta\text{pH}$ . L'augmentation graduelle de la fluorescence du 9-AA (période entre les larges flèches blanche et noire) est attribuable à la photoréduction de l'accepteur d'électrons FeCN. La quantité de FeCN photoréduit peut être estimée par la baisse de la fluorescence  $\Delta F_S$  lors de l'addition d'une quantité connue (0,1  $\mu\text{M}$ ) de FeCN.

Evron and McCarty



**Figure 1.10** Spectres d'excitation (ext) et d'émission (ems) du 9-aminoacridine et spectre d'absorbance du ferricyanure de potassium (FeCN ou ici dénoté FeCy) (Evron et McCarty, 2000).

## CHAPTRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Isolation des thylacoïdes

Les expériences ont été réalisées avec des thylacoïdes isolés de bébé feuilles d'épinard (*Spinacea oleracea* L) achetées de l'épicerie locale (Trois-Rivières). Pour répondre à nos objectifs, des mesures de l'efficacité photochimique, du gradient de protons et du taux de transport photosynthétique d'électrons ont été effectuées chez des thylacoïdes traitées ou non avec l'AAPH (générateur de radicaux libres) ou l'AS.

Toutes les étapes de l'isolation se sont déroulées sous lumière verte, à 4 °C selon la méthode de Whitmarsh et Ort (1984). Cinquante grammes (g) de jeunes feuilles d'épinard ont été lavés à l'eau distillée après que la nervure centrale ait été enlevée. Ensuite, les feuilles ont été broyées (3 brèves pulsations de 2-3 secondes) à l'aide d'un mélangeur domestique refroidi. La solution de broyage (250 ml) utilisée consistait en 0,3 M NaCl, 30 mM Tricine-NaOH (pH de 7,8), 3 mM MgCl<sub>2</sub> et 0,5 mM Na<sub>4</sub>-EDTA. L'homogénat obtenu a été filtré à travers une épaisseur de Miracloth, puis centrifugé à 4130 rpm pendant 2 min à 4 °C. Le surnageant a été ensuite éliminé, puis le culot a été délicatement resuspendu à l'aide d'un pinceau à poils doux dans une solution (de 0,2 M sorbitol, 5 mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 2 mM MgCl<sub>2</sub> et 0,5 mg mL<sup>-1</sup> BSA. Une seconde centrifugation d'une durée de 20 s (4130 rpm, 4 °C) suivait. Le surnageant était filtré à travers un tissu Kimwipe pour en retirer les débris. Le filtrat recueilli était de nouveau centrifugé (4130 rpm, 3 min, 4 °C). Le surnageant obtenu était éliminé, les culots obtenus dans chaque tube étaient combinés et resuspendus au pinceau dans 2 ml de solution de resuspension contenant de 0,2 M sorbitol, 0,05M PO<sub>4</sub>-NaOH (pH 7,5), 2 mM MgCl<sub>2</sub> et 0,5 mg mL<sup>-1</sup> BSA.

Pour déterminer la concentration finale en chlorophylles (a+b) de chaque échantillon, 50  $\mu\text{L}$  de suspension a été ajouté à 10 mL d'acétone 80 % et filtré. L'absorbance était ensuite lue à 647 nm, 664 nm et 750 nm. La concentration en chlorophylles totales était calculée en  $\mu\text{g Chls mL}^{-1}$  selon l'équation de Porra *et al.* (1989) :  $\text{Chla+b} = 17,76 \cdot (\text{A}_{647} - \text{A}_{750}) + 7,34 \cdot (\text{A}_{664} - \text{A}_{750})$ .

## 2.2 Traitements

Les thylacoïdes ont été soumis à deux différents traitements :

### 2.2.1 Traitement AAPH

L'AAPH est un composé soluble dans l'eau qui subit une décomposition thermique au cours du temps pour produire des radicaux libres. Il est généralement utilisé à 37 °C. Dans notre cas, des expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer la température optimale pour préserver l'intégrité des thylacoïdes, c.-à-d. leur capacité de formation du  $\Delta\text{pH}$  et leur activité photochimique. Ces expériences préliminaires ont montré qu'une température de 33 °C était optimale pour à la fois assurer l'intégrité des thylacoïdes et la génération de radicaux libres par l'AAPH (résultats non-présentés). Par conséquent, les thylacoïdes ont été incubés dans un bain-marie à 33 °C pendant 20 min avec différentes concentrations d'AAPH : 0; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 et 10 mM pour les mesures de  $\Delta\text{pH}$ . Considérant de larges différences de sensibilité du  $\Delta\text{pH}$  et de l'activité photochimique dans les thylacoïdes (voir section 3.2), les concentrations de 0, 20, 50, 100, 150, 200, et 300 mM ont été utilisées pour les mesures du rendement photochimique maximal du PSII ( $F_v/F_m$ ) et opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ ). Nos expériences ont été répétées trois fois de façon aléatoire avec trois préparations distinctes de thylacoïdes.

### 2.2.2 Traitement AS

Les thylacoïdes ont été traités avec l'AS à des concentrations définies à partir d'expériences préliminaires, soit : 0; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 et 10 mM à température

ambiante (23 °C) pendant 15 min pour les mesures du rendement photochimique maximal du PSII ( $F_v/F_m$ ) et opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ ) ainsi que pour le  $\Delta pH$ . Nos expériences ont été répétées trois fois de façon aléatoire avec trois préparations distinctes de thylacoïdes ( $n = 3$ ).

### **2.3 Estimations de l'efficacité photochimique par la fluorescence de la Chl *a***

Les mesures du rendement quantique maximum à l'obscurité ( $F_v/F_m$ ) et du rendement quantique opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ ) du PSII chez les thylacoïdes ont été enregistrées à l'aide de l'appareil XE-PAM (Walz, Allemagne). Chaque échantillon contenant une suspension de thylacoïdes (volume final : 2 mL) a été placé dans une cuvette en plastique avec agitation durant les mesures. D'abord, le niveau minimal de la fluorescence ( $F_0$ ) a été enregistré.  $F_0$  représente la dissipation d'énergie réémise sous forme de fluorescence par les antennes collectrices de lumière lorsque le  $P_{680}$  est à l'état oxydé. Ensuite, un flash saturant a été appliqué pour induire le niveau maximal de fluorescence ( $F_m$ ) au moment où tous les centres réactionnels étaient fermés. Les données ont été enregistrées à l'aide d'un logiciel (Wincontrol, Walz). Les valeurs  $F_0$  et  $F_m$  ont été utilisées pour calculer le rendement photosynthétique maximal ( $F_v/F_m$ , où  $F_v = F_m - F_0$ ) comme défini par (Genty *et al.*, 1996). Ensuite, 1,5 mM de ferricyanure de potassium FeCN (accepteur d'électrons) a été ajouté dans le même échantillon. L'échantillon était ensuite illuminé par une lumière rouge de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pendant 3 min et le  $F_s$  (niveau stationnaire) a été enregistré. Ensuite, trois flashes saturants ont été donnés à chaque minute pour pouvoir enregistrer le  $F_m'$ . Le but de ces mesures était d'évaluer l'activité photochimique des thylacoïdes suite à un stress oxydatif (AAPH) ou/et un découpleur (AS) par la fluorescence chlorophyllienne.

### **2.4 Estimations du gradient de protons et du taux de transport photosynthétique d'électrons par la fluorescence du 9-aminoacridine**

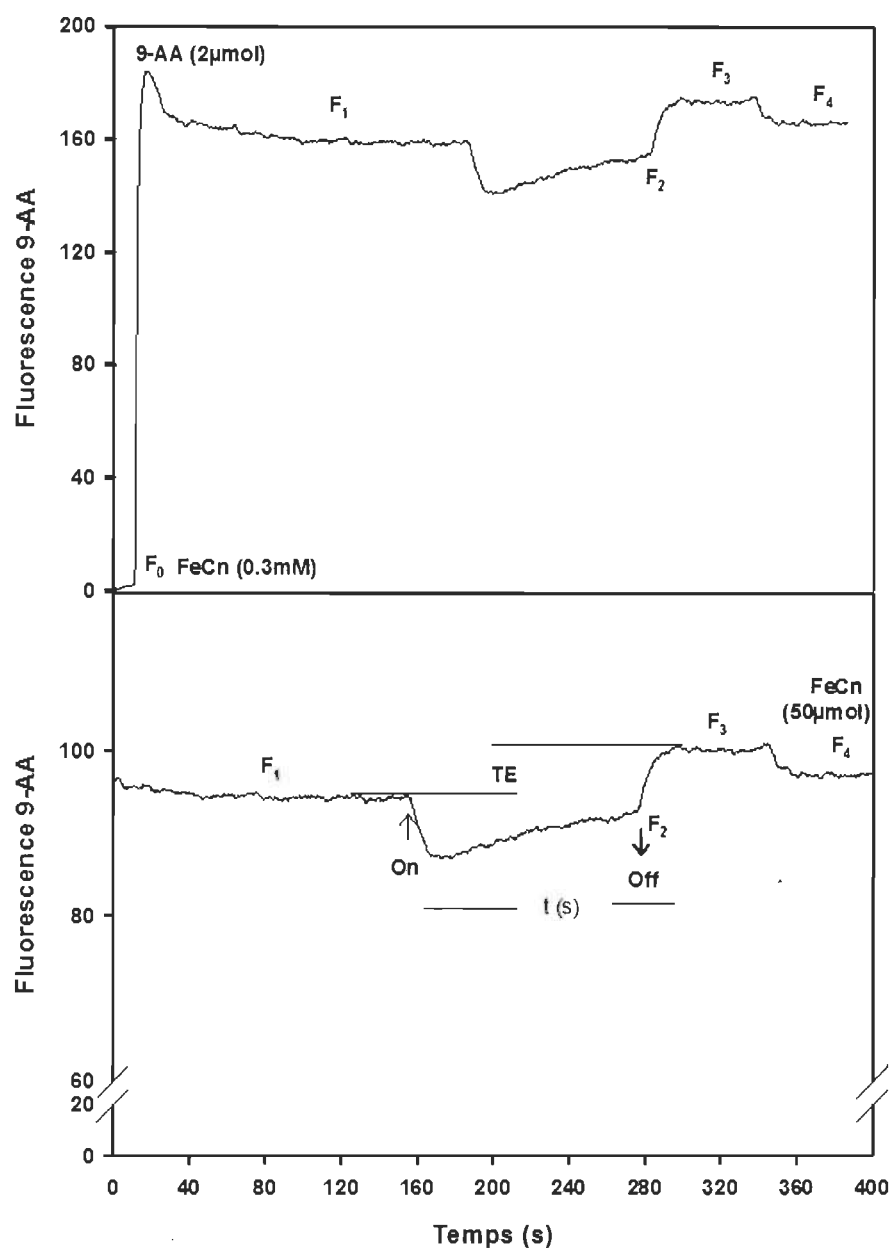
Les mesures des taux de transport d'électrons et du gradient de pH ont été effectuées à partir de suspensions de thylacoïdes selon la méthode d'Evron et McCarty



(2000) légèrement modifiée. Tout d'abord, la fluorescence du 9-aminoacridine (F9-AA) a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre XE-PAM (Walz, Effeltrich, Allemagne). Les filtres utilisés à l'excitation (UV-A/B) et à l'émission (bleu-vert) étaient respectivement BG18 + UG11 et KV418 + BG18. Chaque échantillon (volume final : 2 mL) était placé dans une cuvette de quartz. La source d'excitation UV et le détecteur de la fluorescence étaient à 90° dans la cellule du XE-PAM. Une courbe représentative de la F9-AA avec les différents niveaux de fluorescence est présentée à la figure 2.1. Le  $F_0$  a été d'abord établi à partir de la fluorescence émise par l'échantillon contenant l'aliquot de thylacoïdes ( $30 \mu\text{g Chls mL}^{-1}$ ), 0,3 mM FeCN (pour supporter le transport d'électrons) et le milieu d'essai. Le 9-AA ( $2 \mu\text{M}$ ) était ajouté et l'émission de la fluorescence de l'échantillon à l'obscurité était enregistrée jusqu'à l'atteinte d'un niveau stationnaire ( $F_1$  obscurité). L'échantillon était ensuite illuminé durant 120 secondes par une lumière rouge de  $300 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  acheminée par une fibre optique positionnée en-dessous de la cuvette (à 90° de l'excitation et la détection de la fluorescence). Cette illumination induisait une atténuation (quenching) de la F9-AA. Le niveau de la F9-AA à la fin de cette illumination était noté (niveau  $F_2$ , Figure 2.1). À la fin de l'illumination rouge, la F9-AA augmentait rapidement pour atteindre graduellement le niveau  $F_3$  après équilibre. Le quenching de la F9-AA était finalement déterminé comme suit  $Q_{9-AA} = (F_3 - F_2 / F_3 - F_0)$  puis exprimé en pourcentage (Figure 2.1).

À la fin de l'expérience, 50  $\mu\text{mol}$  de FeCN ont été ajoutés causant une diminution de la fluorescence à un niveau  $F_4$  ( $F_3 - F_4$ ) permettant d'exprimer la hausse de la fluorescence durant l'illumination ( $F_3 - F_1$ ) en quantité d'électrons par unité de temps et de chlorophylles (Figure 2.2). Selon Evron et McCarty (2000), l'augmentation de la F9-AA durant illumination ( $F_3 - F_1$ ) normalisée par la baisse de fluorescence induite par une concentration connue de FeCN ( $F_3 - F_4$ ) permet d'estimer le taux de transport d'électrons (TE) (Figure 2.1) comme suit :

$$\text{TE } (\mu\text{mol(FeCN)} (\text{mg(Chl)})^{-1} \text{h}^{-1}) = (F_3 - F_1 / F_3 - F_4) * [\text{FeCN}] * 3600 / t(\text{s}) * 1000 / \mu\text{gChl}$$



**Figure 2.1** Cinétique de la fluorescence du 9-aminoacridine (F9-AA) permettant d'estimer simultanément le gradient de protons ( $\Delta pH$ ) et le taux de transport photosynthétique d'électrons (TE) selon la méthode d'Evron et McCarty (2000). Voir texte pour détails additionnels.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

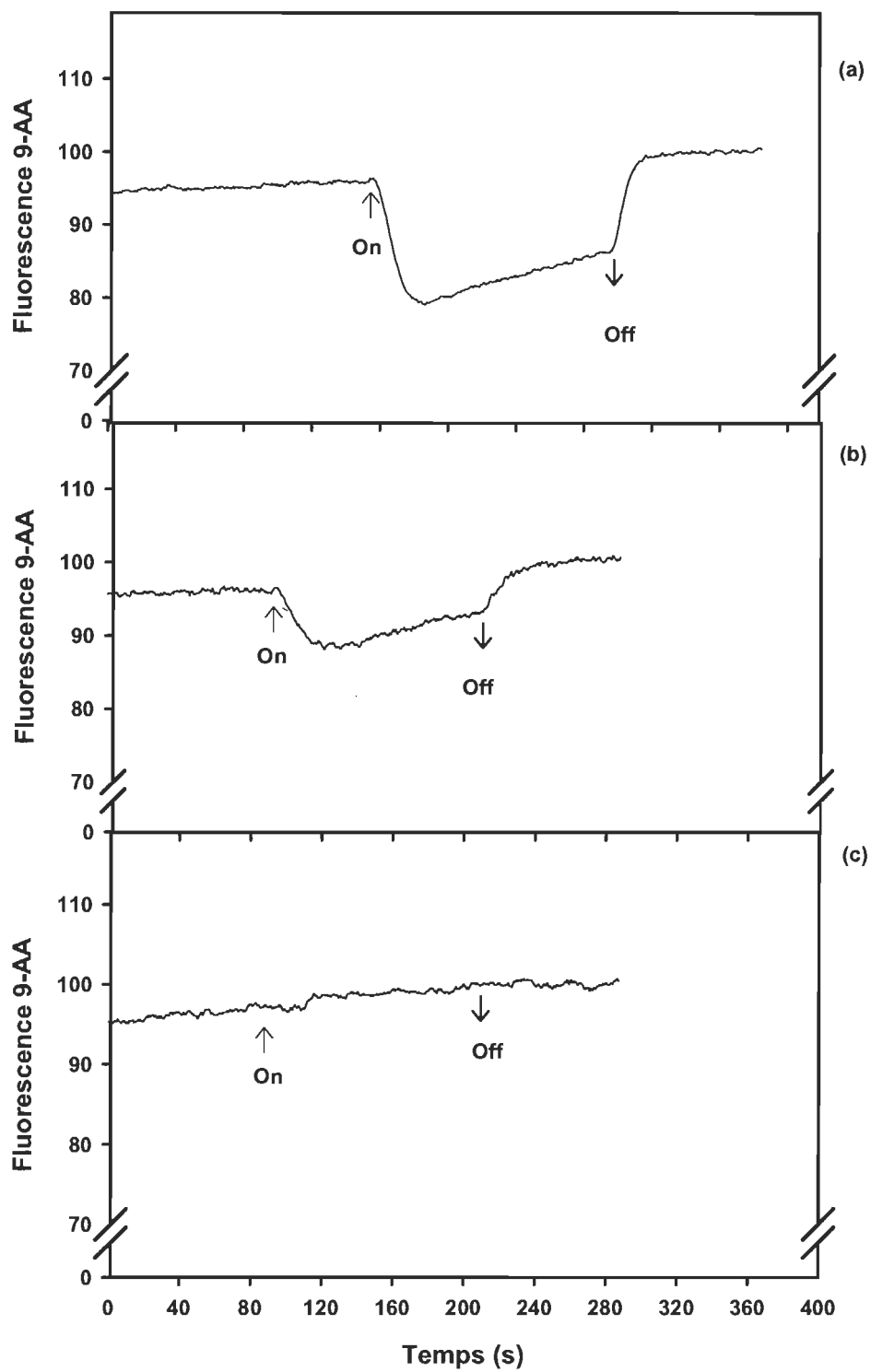
#### 3.1 Effet inhibiteur du DCMU et du découpleur $\text{NH}_4\text{Cl}$ sur la fluorescence du 9-aminoacridine

Dans une première partie, des expériences ont été réalisées afin de vérifier l'effet inhibiteur du DCMU et du découpleur  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur le transport d'électrons des thylacoïdes. La concentration finale du DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea) a été fixée à 15  $\mu\text{M}$ . La figure 3.1 montre des cinétiques représentatives de fluorescence du 9-AA (F9-AA) mesurées chez des thylacoïdes contrôles et traités en présence du DCMU ou du  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Chez des thylacoïdes contrôles, l'illumination induit une baisse (quenching) rapide de la F9-AA causée par l'acidification du lumen (formation de  $\Delta\text{pH}$ ). Cette baisse rapide est suivie d'une lente augmentation de la F9-AA attribuable à la photoréduction du  $\text{FeCN}$  (Evron et McCarty, 2000). Chez des thylacoïdes traités en présence de 0,3 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Figure 3.1b), nous observons par rapport aux thylacoïdes contrôles une diminution du quenching de la F9-AA. Cependant, le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,3 mM) n'a aucun effet apparent sur le taux de transport d'électrons (photoréduction du  $\text{FeCN}$ ), c.-à-d. sur l'augmentation de la F9-AA durant l'illumination. Quant aux thylacoïdes traités en présence de DCMU (Figure 3.1c), il y avait une inhibition complète du transport d'électrons photosynthétiques, et conséquemment une inhibition du gradient de proton transmembranaire ( $\Delta\text{pH}$ ). La méthode d'Evron et McCarty (2000) permet donc de démontrer à la fois les effets découpleur et inhibiteur du transport d'électrons.

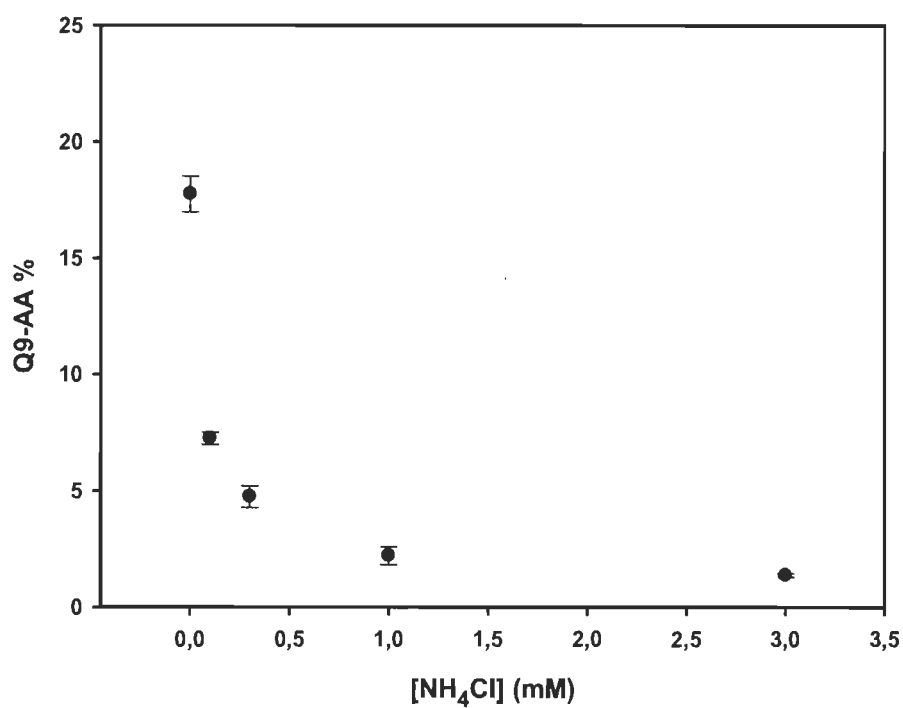
L'utilisation du chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) à des concentrations croissantes a atténué exponentiellement la formation du gradient de protons à travers la membrane des thylacoïdes. La figure 3.2 montre qu'une concentration de 0,3 mM était suffisante pour diminuer de moitié ( $\text{IC}_{50} \approx 0,3 \text{ mM}$ ) le quenching de la F9-AA (Q9AA). Par contre, la

figure 3.3 montre que cet effet inhibiteur du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur le  $\Delta\text{pH}$  (estimé par le Q9AA) n'était pas accompagné par une stimulation telle qu'attendue du taux transport d'électrons.

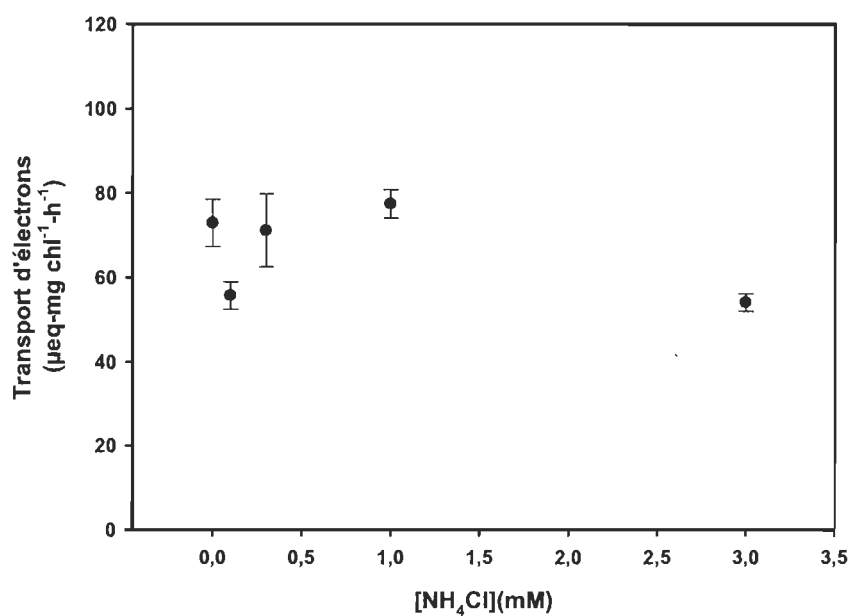
Enfin, pour mieux démontrer l'effet découpleur du  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , il importe de démontrer que son effet inhibiteur sur le  $\Delta\text{pH}$  est effectivement causé par une plus grande perméabilité des thylacoïdes vis-à-vis les protons plutôt que par une inhibition du transport d'électrons (comme pour le DCMU). Les cinétiques des courbes de relaxation du quenching de la F9-AA à la fin de la période d'illumination ont donc été analysées pour des contrôles où la formation du  $\Delta\text{pH}$  était importante, et pour une concentration de 0,3 mM où le découpleur  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a inhibé le  $\Delta\text{pH}$  de moitié ( $\text{IC}_{50} \approx 0,3 \text{ mM}$ ). Nos résultats montrent que  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a accéléré la relaxation du quenching de la F9-AA : la moyenne de la constante de régression  $1/b$  des relaxations exponentielles du Q9-AA des thylacoïdes traités avec 0,3 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  était  $\approx 23,6 \text{ s}$  tandis que cette constante de relaxation pour les thylacoïdes contrôles était de  $\approx 30,6 \text{ s}$  (Figure 3.4). Un test de  $t$  indique que cette différence est statistiquement significative ( $p \leq 0.05$ ). Donc une diminution du quenching du 9-AA induit à la lumière accompagnée d'une accélération de la relaxation du Q9-AA après illumination sont deux observations qui démontrent bien que l'effet inhibiteur d'une substance sur le  $\Delta\text{pH}$  résulte de son effet découpleur et non pas de son effet inhibiteur sur le transport d'électrons.



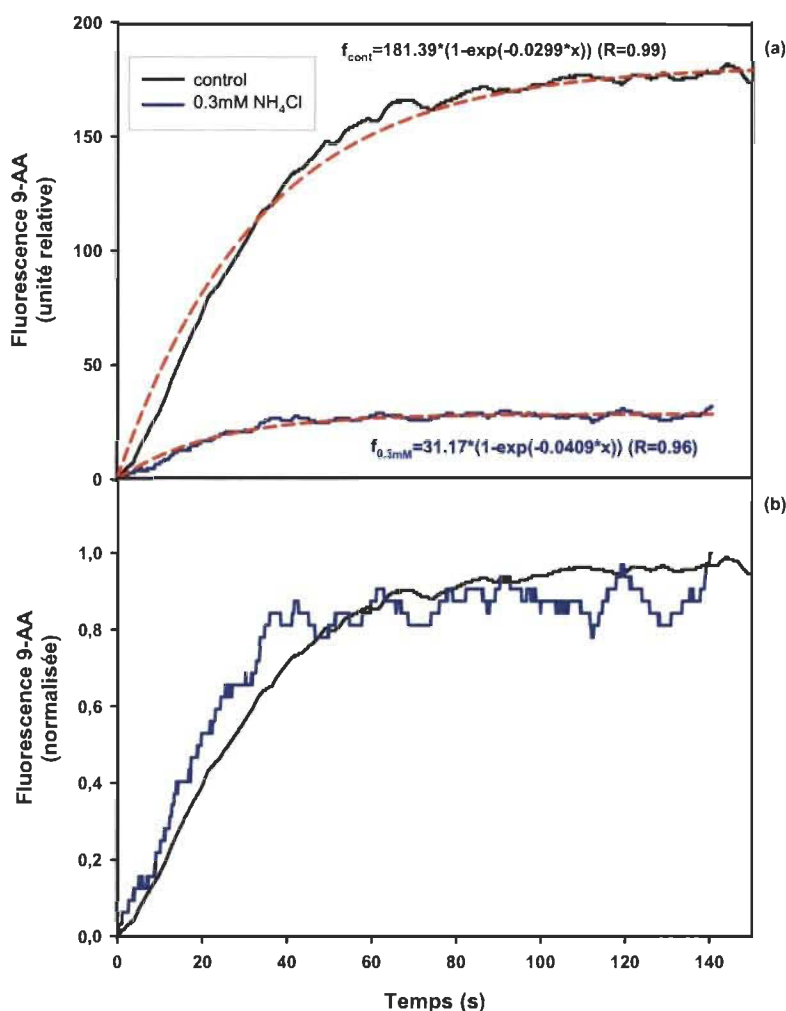
**Figure 3.1** Cinétiques de la fluorescence du 9-AA chez des thylacoïdes d'épinard : (a) contrôles et (b) traités avec  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,3 mM) et (c) traités avec DCMU (15  $\mu\text{M}$ ).



**Figure 3.2** Inhibition du quenching de la fluorescence du 9-aminoacridine (Q9-AA) chez des thylacoïdes d'épinard traités avec différentes concentrations de NH<sub>4</sub>Cl.



**Figure 3.3** Valeurs moyennes du taux de transport d'électrons chez des thylacoïdes d'épinard en fonction de la concentration en NH<sub>4</sub>Cl.



**Figure 3.4** Courbes de relaxation de la fluorescence du 9-AA suivant la période d'illumination à  $300 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mesurées chez des thylacoïdes contrôles (noir) et traités en présence de 0,3 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (bleu). Courbes de relaxation du quenching de la fluorescence du 9-AA en unités relatives non-normalisées (a) et normalisées à 1 (b).

### 3.2 Effets des radicaux libres (AAPH) sur le transport d'électrons et le gradient de protons

Notre deuxième partie expérimentale visait à démontrer les effets inhibiteurs des radicaux libres générés par AAPH sur la chaîne de transport d'électrons et la formation du gradient de pH transmembranaire sur des thylacoïdes photochimiquement actifs. Pour déterminer le fonctionnement du PSII de la chaîne de transport d'électrons, les

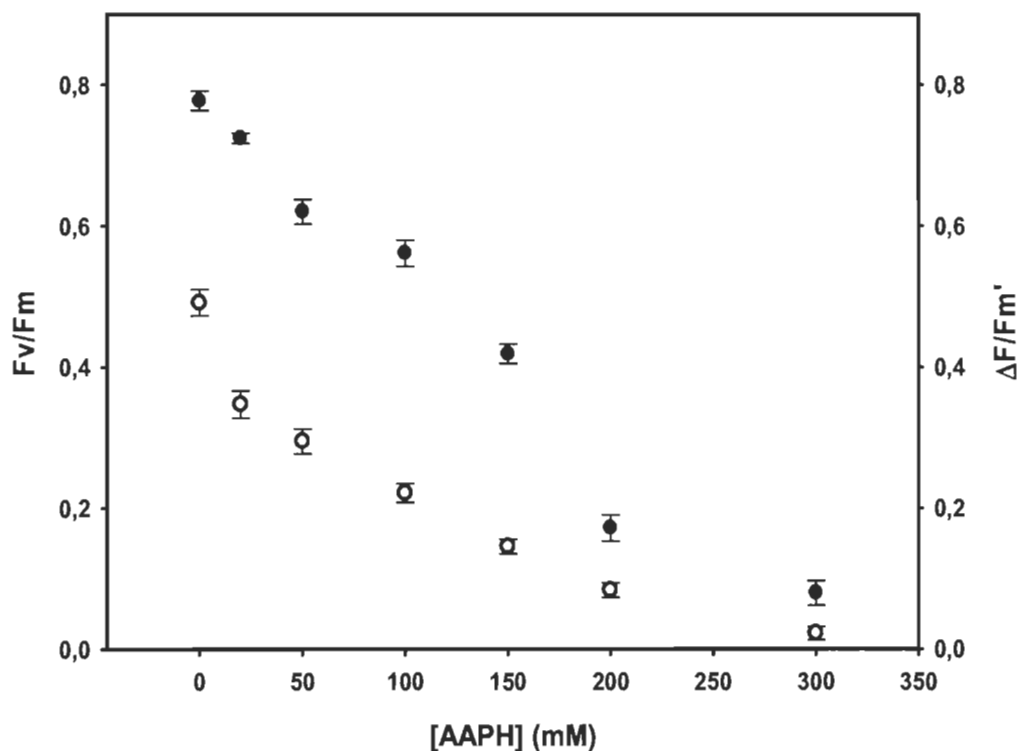
rendements quantiques maximum ( $F_v/F_m$ ) et opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ ) du PSII ont été mesurés après 20 min de traitement à différentes concentrations d'AAPH qui variaient de 0, 20, 50, 100, 150, 200, et 300 mM (avec un nombre de répétitions  $n = 4$ ). Les résultats obtenus montrent tel qu'attendu que  $F_v/F_m$  et  $\Delta F/F_m'$  diminuent avec l'augmentation des concentrations d'AAPH. Les valeurs de la concentration inhibitrice à 50 % ( $IC_{50}$ ) étaient de  $\approx 130$  mM pour les mesures de  $F_v/F_m$  et de  $\approx 80$  mM pour les mesures de  $\Delta F/F_m'$  (Figure 3.5).

Nos résultats ont montré que les RL générés par l'AAPH ont inhibé non seulement le transport d'électrons générés par le PSII ( $\Delta F/F_m'$ ) et les réactions photochimiques du PSII ( $F_v/F_m$ ) mais aussi la formation du gradient de protons transmembranaire ( $\Delta pH$ ). Les Figures 3.6 et 3.7 montrent que l'AAPH a fortement inhibé le gradient de protons transmembranaire des thylacoïdes ( $IC_{50} \approx 1$  mM). À 10 mM AAPH, le  $\Delta pH$  était pratiquement aboli. Ainsi, l'AAPH a un effet plus nettement prononcé sur le  $\Delta pH$  que sur les réactions photochimiques du PSII ( $IC_{50} \approx 80$  et 130 mM pour  $\Delta F/F_m'$  et  $F_v/F_m$  respectivement). Cette grande différence de sensibilité explique pourquoi l'effet inhibiteur du AAPH sur le  $\Delta pH$  n'a pu être observé simultanément avec l'effet inhibiteur du AAPH sur le transport d'électrons estimé selon la Evron et McCarty (2000) (voir sections 1.9 et 2.4). En effet, pour des concentrations d'AAPH variant de 0 et 10 mM, suffisantes pour inhiber la formation du  $\Delta pH$ , aucun effet significatif de l'AAPH sur le taux de transport d'électrons n'a pu être détecté (Figure 3.8). Un taux moyen de transport d'électrons de  $62,7 \mu\text{eq-mg chl}^{-1}\text{h}^{-1}$  a été estimé pour les thylacoïdes contrôles (sans ajout de l'AAPH). De plus, les résultats n'indiquent aucune stimulation du taux de transport d'électrons en présence de faibles concentrations d'AAPH (Figure 3.9), tel qu'observé pour le découpleur  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Figure 3.3).

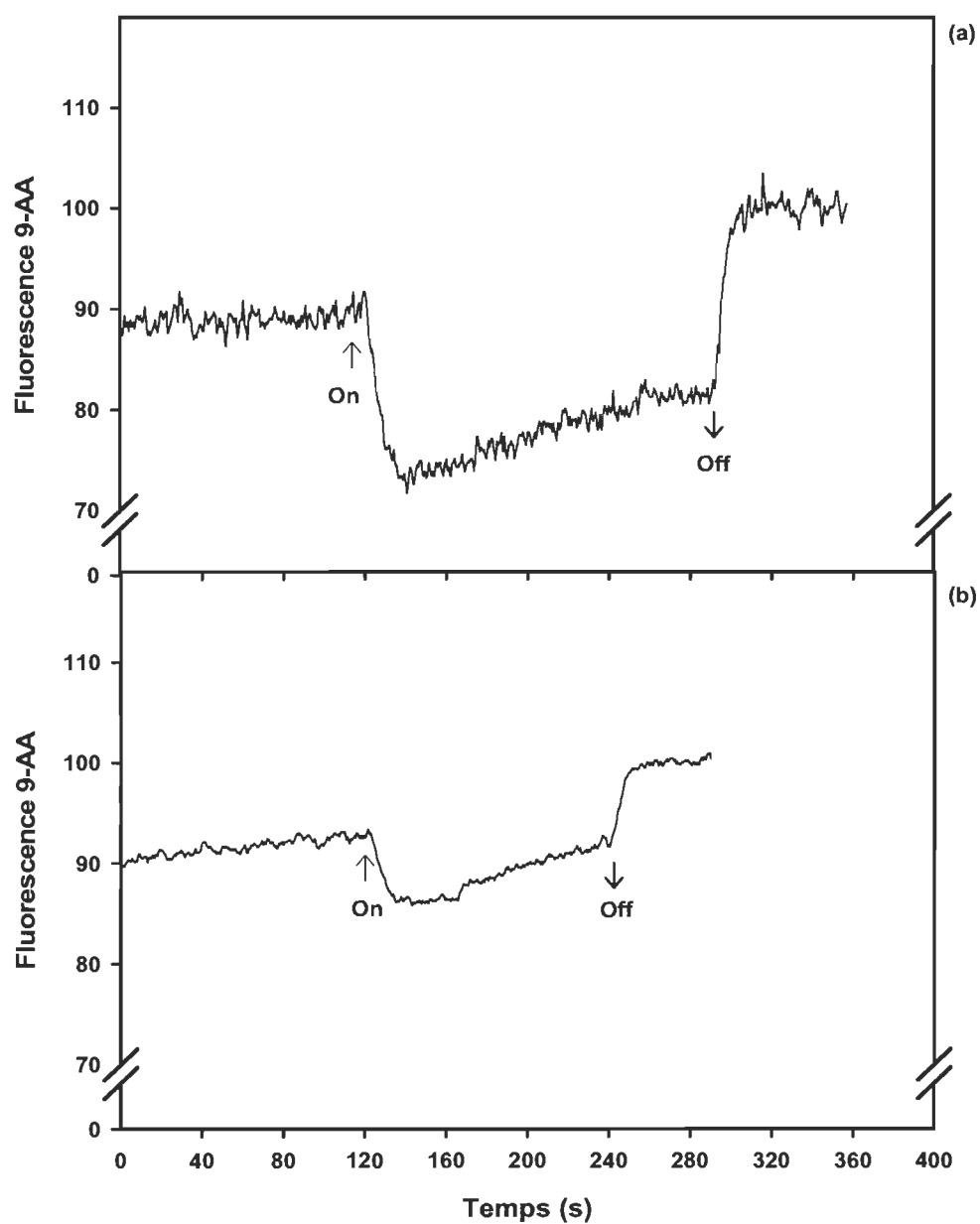
Pour s'assurer que l'abolition du  $\Delta pH$  par l'AAPH est vraiment causée par un effet découpleur, les constantes des courbes de relaxation du quenching de la F9-AA (Q9-AA) à la fin de la période d'illumination ont été mesurées chez des thylacoïdes contrôles et traités (Figure 3.9). Cette constante de relaxation chez les thylacoïdes contrôles après incubation à 33 °C pendant 20 min était de 25 s. tandis qu'à une



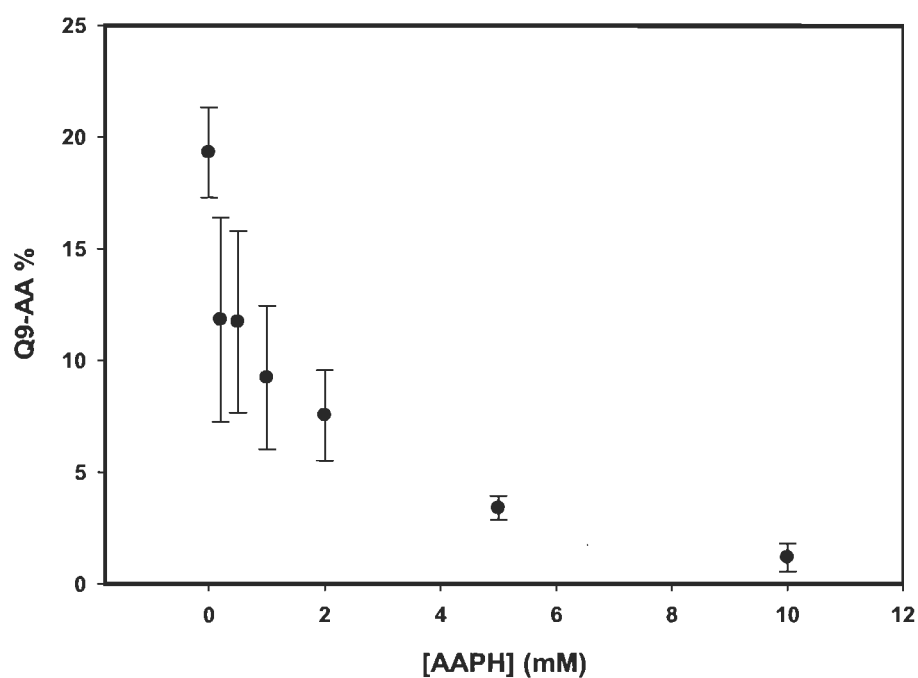
concentration inhibitrice de 50 % ( $IC_{50} \approx 1 \text{ mM AAPH}$ ), cette constante était de 22 s. Un test de t indique que cette différence, quoique faible, est statistiquement significative ( $p \leq 0.05$ ).



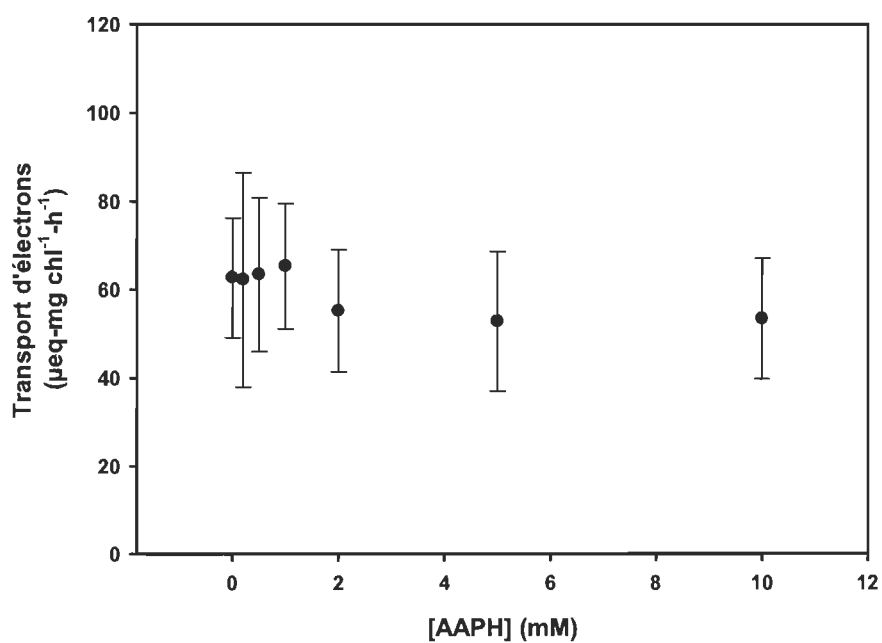
**Figure 3.5** Valeurs moyennes du rendement photochimique maximal du PSII ( $F_v/F_m$ , ●) et du rendement photochimique opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ , ○) des thylacoïdes en fonction de [AAPH].



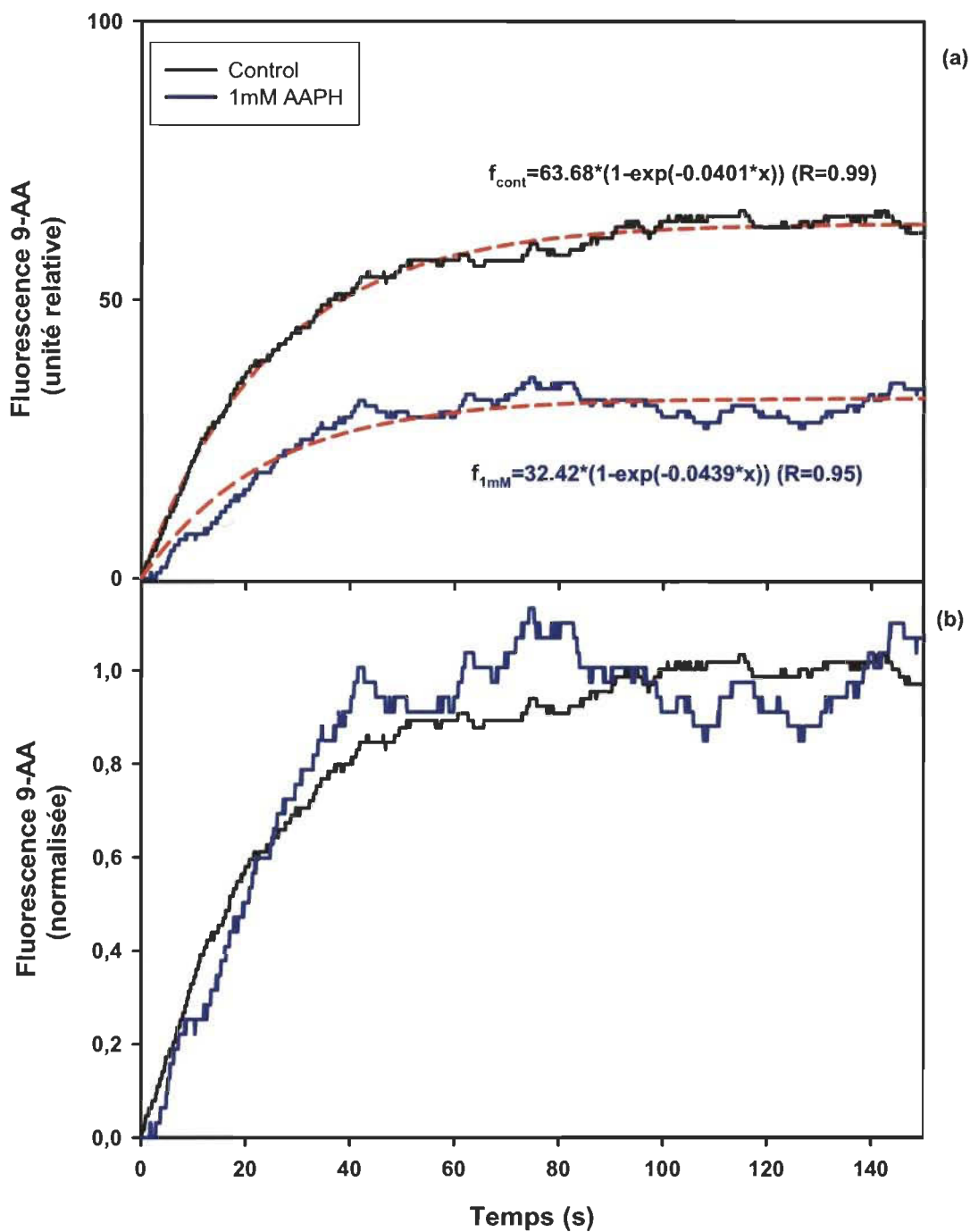
**Figure 3.6** Cinétique de la fluorescence du 9-AA chez des thylacoïdes d'épinard incubé à 33 °C après 20 min : (a) control et (b) traités avec AAPH [1 mM].



**Figure 3.7** Inhibition du quenching de la fluorescence du 9-aminoacridine (Q9-AA) chez des thylacoïdes d'épinard traités avec différentes concentrations d'AAPH.



**Figure 3.8** Valeurs moyennes du taux de transport d'électrons chez des thylacoïdes d'épinard en fonction de la concentration en AAPH (entre 0 et 10 mM).

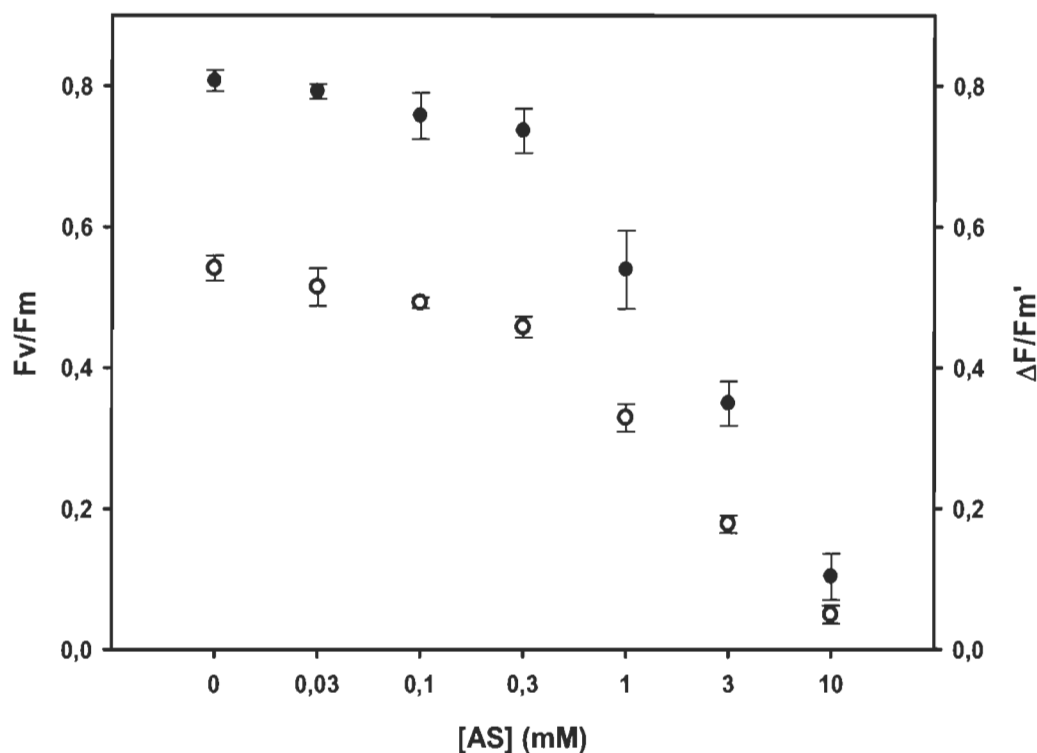


**Figure 3.9** Courbes de relaxation de la fluorescence du 9-AA suivant la période d'illumination à  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mesurées chez des thylacoïdes contrôles et traités en présence d'AAPH (1 mM) : (a) unité relative et (b) unité normalisée à 1 de fluorescence du 9-AA.

### 3.3 Effets de l'acide salicylique sur le transport d'électrons et le gradient de protons

Notre dernière partie cherchait à mettre en évidence les effets inhibiteur ou/et découpleur de l'acide salicylique sur la chaîne de transport d'électrons et le gradient de protons transmembranaire des thylacoïdes d'épinard. Nos résultats (obtenus après une incubation de 15 min à 23° à différentes concentrations d'AS qui variaient de 0 à 10 mM) indiquent que l'AS agit à la fois en tant que découpleur et inhibiteur de la chaîne de transport d'électrons.

De manière générale, pour des concentrations inférieures à 1 mM, l'AS n'affecte pas significativement le rendement photochimique maximum ( $F_v/F_m$ ) et opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ ). Par contre à des concentrations plus élevées, l'activité de transport d'électrons a été considérablement inhibée (Figure 3.10).



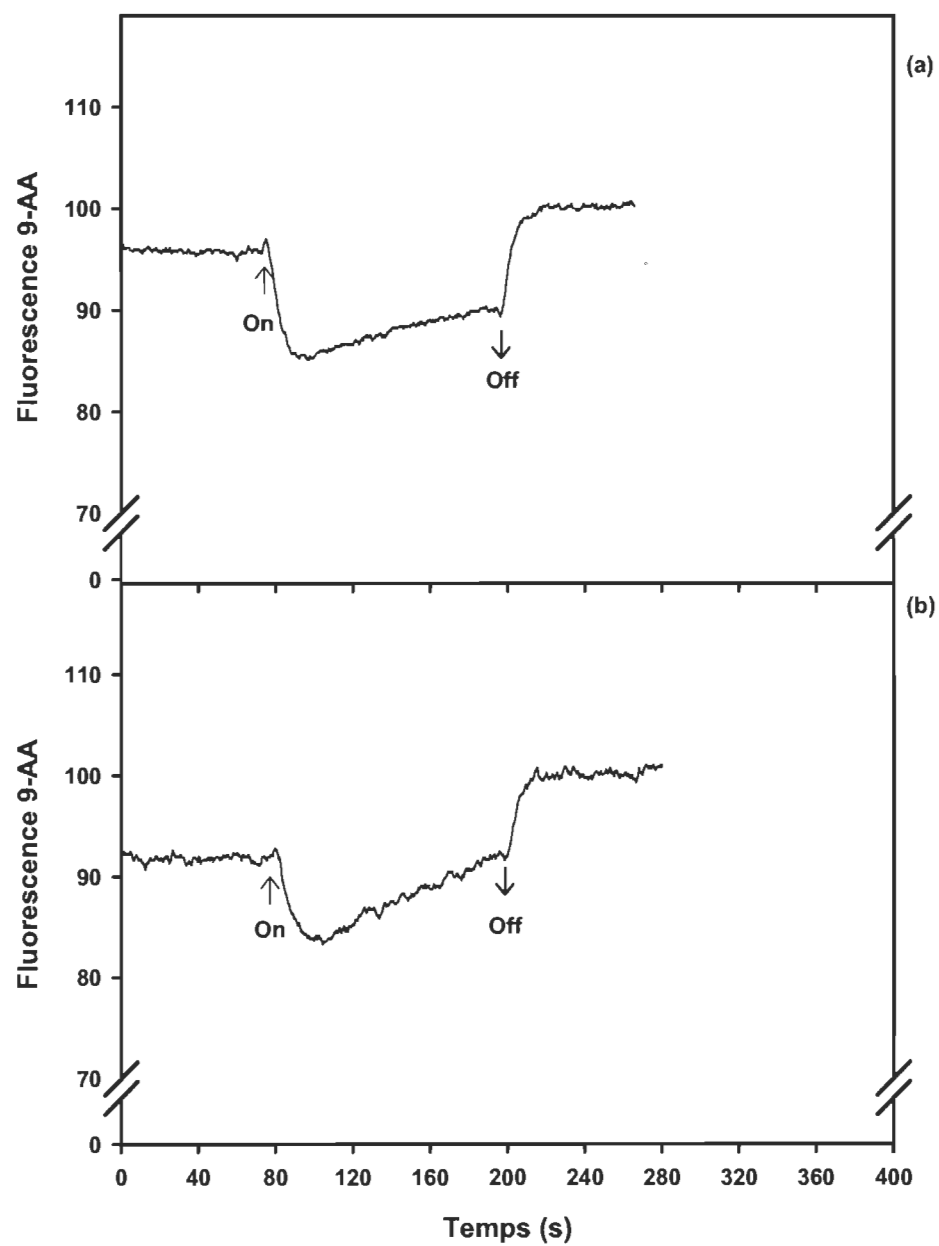
**Figure 3.10** Valeurs moyennes du rendement photochimique maximal du PSII ( $F_v/F_m$ ) et du rendement photochimique opérationnel ( $\Delta F/F_m'$ ) des thylacoïdes en fonction de [AS].

Pour notre témoin (sans ajout de l'AS), des moyennes de  $0,80 \pm 0,01$  et  $0,5415 \pm 0,01$  ont été enregistrées pour les mesures de  $F_v/F_m$  et  $\Delta F/F_m'$  respectivement. Des baisses de 50 % ont été observées pour des concentrations de 2,9 mM et 2,0 mM pour les paramètres  $F_v/F_m$  pour  $\Delta F/F_m'$  respectivement (Figure 3.10).

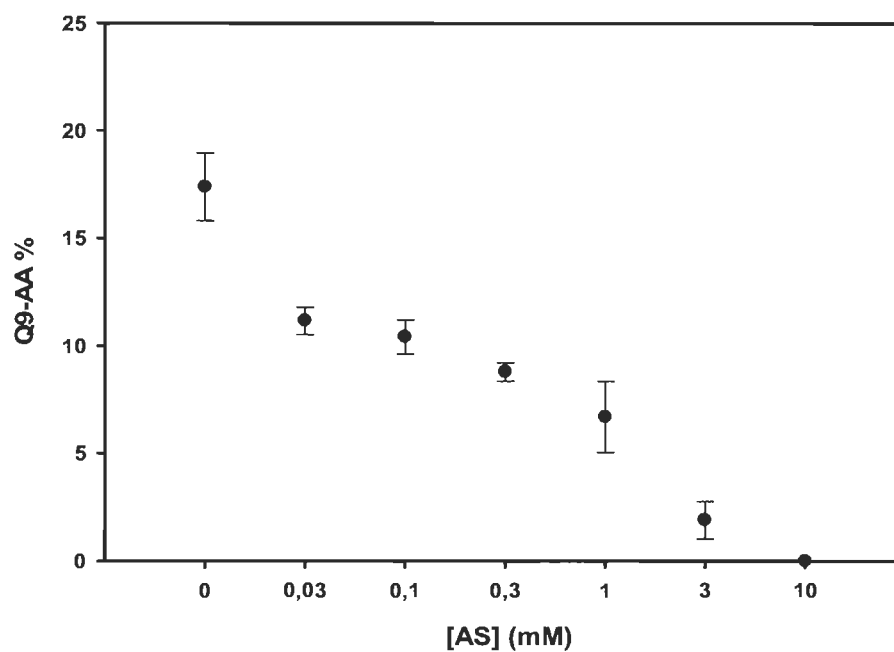
Comme pour l'AAPH, l'AS affecte aussi la formation du  $\Delta pH$  estimé par le quenching de la F9-AA (Q9AA). La valeur moyenne de Q9AA du contrôle s'élevait à  $17,37 \pm 1,5$  (Figure 3.12). Cette valeur diminuait avec l'augmentation de la concentration d'AS, avec une valeur de  $IC_{50} \approx 0,3$  mM. Comme pour l'AAPH, l'AS affecte donc davantage la formation du gradient de protons que le transport d'électrons ( $IC_{50} \approx 0,3$  mM versus  $IC_{50} \approx 2-3$  mM) (Figures 3.12 et 3.13).

Cependant, il est intéressant de noter qu'en plus de son effet inhibiteur, l'AS à des concentrations inférieures à 1 mM a causé une augmentation d'environ 50 % du taux de transport d'électrons tel qu'estimé par la méthode de Evron et McCarty (2000). Cette stimulation étant significative à 0,3 mM.

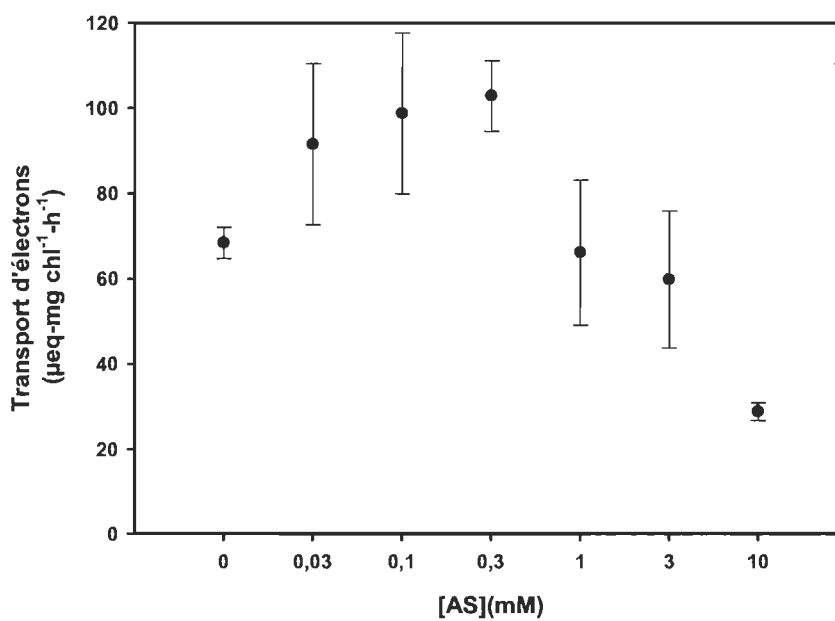
Comme pour l'AAPH, les résultats obtenus avec l'AS montrent que le temps de relaxation du quenching de la F9-AA diminue avec l'augmentation des concentrations de l'AS. Chez les thylacoïdes contrôles incubés à température ambiante pendant 15 min, le temps de relaxation était de 26 s tandis qu'à une concentration inhibitrice à 50 % ( $IC_{50} \approx 0,3$  mM), le temps de relaxation a baissé à 22 s (Figure 3.14). Un test de t indique que cette différence, quoique faible, est statistiquement significative ( $p \leq 0.05$ ).



**Figure 3.11** Cinétique de la fluorescence du 9-AA chez des thylacoïdes d'épinard à 23 °C après 15 min : (a) control et (b) traités avec AS [0,3 mM].

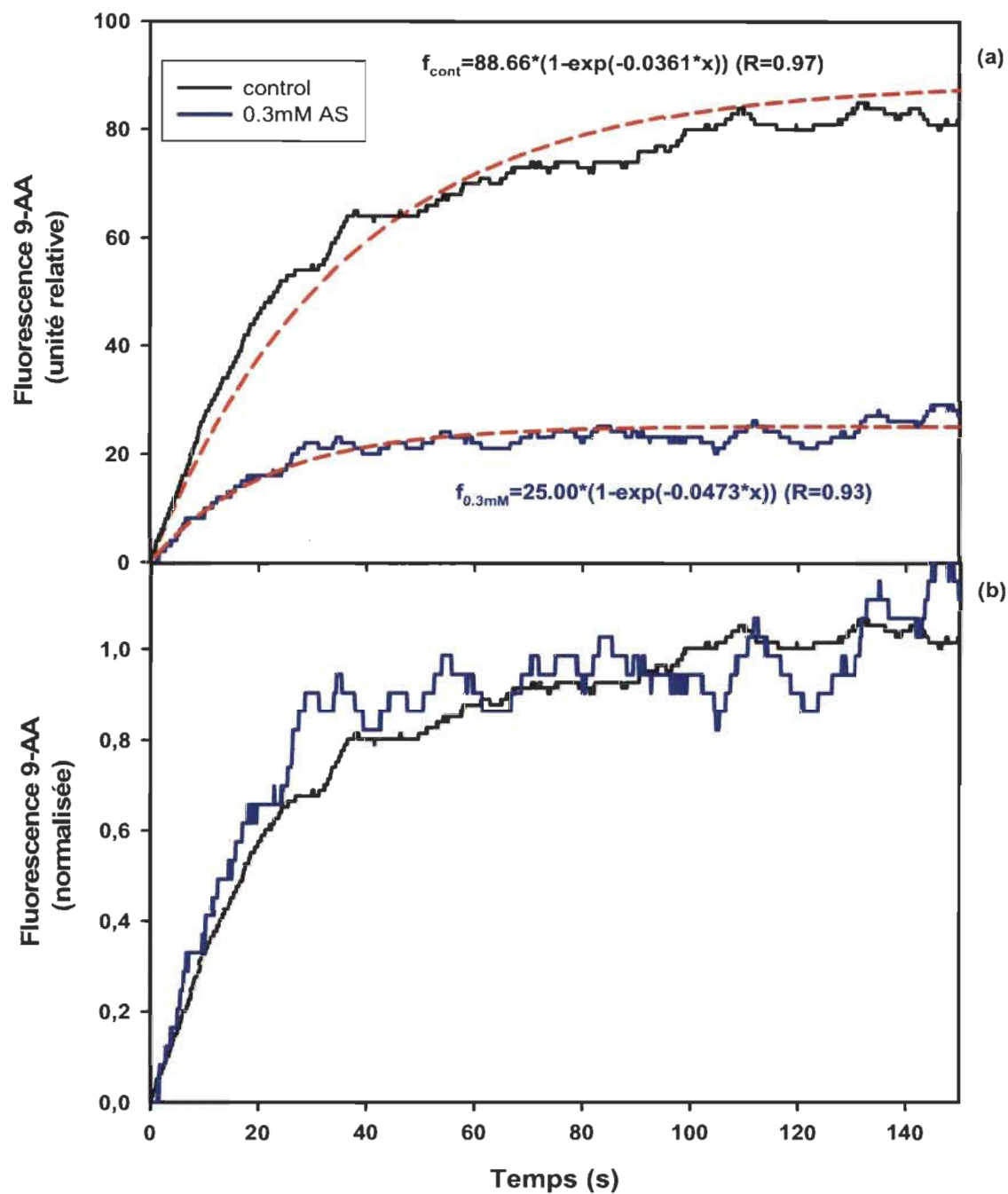


**Figure 3.12** Inhibition du quenching de la fluorescence du 9-aminoacridine (Q9-AA) chez des thylacoïdes d'épinard traités avec différentes concentrations d'AS.



**Figure 3.13** Valeurs moyennes du taux de transport d'électrons chez des thylacoïdes d'épinard en fonction de la concentration en AS.





**Figure 3.14** Courbes de relaxation de la fluorescence du 9-AA suivant la période d'illumination à  $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mesurées chez des thylacoïdes contrôles et traités en présence d'AS (0,3 mM) : (a) unité relative et (b) unité normalisée à 1 de fluorescence du 9-AA.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION ET CONCLUSION

La conversion photosynthétique du CO<sub>2</sub> atmosphérique en glucides grâce à l'énergie lumineuse est d'une importance vitale non seulement pour les végétaux, mais pour tous les organismes vivants. Cependant, la complexité des réactions photochimiques et biochimiques impliquées rend la photosynthèse particulièrement sensible aux conditions défavorables de l'environnement. Malgré la diversité des « stress environnementaux » (polluants, températures extrêmes, UV, pathogènes, etc.), ceux-ci provoquent tous à différents degrés la production d'un excès de molécules réactives d'oxygène (radicaux libres, RL) pouvant causer de nombreux dommages cellulaires et désordres physiologiques à l'échelle de la plante.

Les effets néfastes des RL engendrés par les différents facteurs environnementaux sur l'assimilation de CO<sub>2</sub> et le transport photosynthétique d'électrons sont relativement bien documentés. Par contre, trop peu d'études ont examiné la susceptibilité relative de la formation d'un gradient de pH vis-à-vis les RL. Par exemple, une plus grande inhibition de la formation du  $\Delta pH$  par rapport au transport d'électrons diminuerait la proportion des quantités d'ATP produits par rapport à celles du NADPH. Or, ces deux molécules énergétiques sont requises dans une proportion bien déterminée de 1,5 ATP/NADPH lors de la réduction du CO<sub>2</sub> en glucides dans le cycle de Calvin (Taiz et Zeiger, 2006).

Face aux conditions adverses de l'environnement, les végétaux sont heureusement capables de s'acclimater. Cette acclimatation est souvent initiée par des phytohormones, dont l'acide salicylique (AS). L'application AS exogène permet d'atténuer les effets néfastes de plusieurs stress environnementaux tels que les métaux lourds et la salinité (Hayat 2010). Cependant, à fortes concentrations, l'AS peut aussi diminuer la croissance

des plantes (Shakirova 2007, Xie et Chen, 1999, Hayat, 2010). Cet effet néfaste de l'AS pourrait être relié à un effet découpleur et inhibiteur du transport d'électrons, tel que déjà observé dans les mitochondries. À notre connaissance, ces effets n'ont jamais été examinés dans les chloroplastes.

Considérant les rôles fondamentaux et complémentaires du gradient de protons et du transport d'électrons pour la photosynthèse, ce projet de maîtrise a donc été entrepris afin de démontrer les effets découpleurs et inhibiteurs des radicaux libres et de l'AS sur le gradient de protons ainsi que sur le transport d'électrons dans les chloroplastes.

#### **4.1 Effet inhibiteur du DCMU et du découpleur $\text{NH}_4\text{Cl}$ démontrés par leurs effets sur la fluorescence du 9-aminoacridine**

Dans une partie préliminaire de ce projet, des mesures de fluorescence du 9-aminoacridine (F9-AA) ont été réalisées afin de démontrer l'efficacité de la principale méthode utilisée, soit celle de Evron et McCarty (2000), pour 1) estimer simultanément le taux de transport d'électrons et le gradient de pH transmembranaire ( $\Delta\text{pH}$ ), ainsi que 2) déterminer si l'inhibition de la formation du  $\Delta\text{pH}$  résulte a) d'une inhibition du transport d'électrons ou b) d'une plus grande perméabilité des thylacoïdes aux protons.

Tout d'abord, l'utilisation du DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurée) a permis de démontrer simplement que l'inhibition du transport photosynthétique d'électrons empêche l'accumulation de  $\text{H}^+$  dans le lumen et donc la formation du  $\Delta\text{pH}$ . En effet, en se fixant au site  $\text{Q}_\text{B}$  du photosystème II, le DCMU bloque le transfert d'électrons au-delà de la plastoquinone primaire  $\text{Q}_\text{A}$ . Ceci empêche la photolyse de l'eau en  $\text{O}_2$  et  $\text{H}^+$  dans le lumen ainsi que le transfert de  $\text{H}^+$  du stroma vers le lumen lors de la réduction et l'oxydation des molécules de plastoquinones.

Ensuite, l'utilisation du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à différentes concentrations visait à démontrer que l'abolition du  $\Delta\text{pH}$  peut être causée par un effet purement découpleur plutôt que par une inhibition du transport d'électron. En effet, il est bien connu que le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  agit en

traversant les membranes des thylacoïdes sous la forme neutre  $\text{NH}_3$ , puis une fois en milieu acide dans le lumen, se lie à un  $\text{H}^+$  pour former  $\text{NH}_4^+$ . Ceci abaisse donc la concentration de  $\text{H}^+$  dans le lumen, y augmentant le pH et donc diminuant le  $\Delta\text{pH}$  (Slovacek et Hind, 1980). En plus d'être bien documentée, j'ai pu démontrer expérimentalement l'effet découpleur du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de deux façons. Premièrement, le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  n'inhibe pas le transport d'électrons. En effet, la fluorescence du 9-AA (F9-AA) augmente graduellement lors de l'illumination chez des thylacoïdes traités avec le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Tel que démontré par Evron et McCarty (2000), cette augmentation de la F9-AA est causée par la photoréduction du FeCN qui agit comme accepteur d'électrons. Cette photoréduction du FeCN diminue son absorbance, qui chevauche celle du 9-AA. Par conséquent, une plus faible absorbance du FeCN suite à sa photoréduction augmente la quantité de lumière pouvant être absorbée par la 9-AA, et donc augmente son émission de fluorescence.

La deuxième évidence expérimentale supportant l'effet découpleur du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  est l'accélération de la relaxation du quenching (atténuation) de la F9-AA (ou Q9-AA) à la fin de l'illumination. Cette relaxation du Q9-AA est causée par les fuites des  $\text{H}^+$  du lumen vers le stroma. Les constantes ( $1/b$ ) de régression [ $f=a*(1-\exp(-b*x))$ ] des relaxations exponentielles de Q9-AA mesurées chez des thylacoïdes contrôle et traités (0,3 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sont de 30,6 s et 23,6 s respectivement ( $p = 0.001$ ). Donc, une diminution du Q9-AA induit à la lumière ainsi qu'une accélération de la relaxation du Q9-AA suivant la période d'illumination sont deux observations démontrant clairement que l'effet inhibiteur d'une substance sur le  $\Delta\text{pH}$  résulte vraiment de son effet découpleur et non pas de son effet inhibiteur sur le transport d'électrons.

Enfin, il est important de noter que sous nos conditions expérimentales, l'effet découpleur du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  n'a eu aucun effet stimulateur sur le taux de transport d'électrons. En fait, cette stimulation du taux de transport d'électrons par le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (ou autre découpleur) dépend fortement de l'intensité lumineuse (Dean et Miskiewicz, 2003). À de fortes intensités, l'acidification du lumen est responsable de deux restrictions limitant le taux de transport d'électrons : a) l'oxydation des plastoquinols ( $\text{PQH}_2$ ) par le

cytochrome f et b) l'interaction entre la plastocyanine et son site de liaison avec le côté lumenal (oxydant) du photosystème I. Par contre, à des intensités lumineuses faibles à modérées comme lors de nos expériences ( $300 \mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), le taux de transport d'électrons est insuffisant pour être limité par ces deux sites de restrictions : il est donc le même pour des thylacoïdes couplés et découplés (Dean et Miskiewicz, 2003).

#### **4.2 Effets des radicaux libres (AAPH) sur le transport d'électrons et le gradient de protons**

Malgré l'importance des radicaux libres (RL) dans l'inhibition de la photosynthèse lors des divers stress environnementaux, leur effet sur l'intégrité des thylacoïdes et donc sur leur capacité à maintenir un gradient de pH nécessaire à la synthèse de l'ATP est peu documenté. J'ai utilisé dans mes expériences l'AAPH (2,2'-azobis amidinopropane 2 dichlorhydrate) comme générateur de RL. Ce composé, avec sa double liaison N=N, se décompose en milieu aqueux pour générer à un taux constant (qui est fonction de la température) des radicaux libres. L'AAPH est notamment utilisé dans les tests de type ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) pour estimer la capacité antioxydante de différents composés (Prior *et al.*, 2005).

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent que les RL générés par l'AAPH ont inhibé les différentes fonctions des thylacoïdes, soit la formation du  $\Delta\text{pH}$ , le transport d'électrons générés par le PSII ( $\Delta\text{F}/\text{Fm}'$ ) ainsi que les réactions photochimiques au sein du PSII ( $\text{Fv}/\text{Fm}$ ). Si ces effets inhibiteurs étaient prévisibles, il a été cependant surprenant de constater que les RL générés par l'AAPH ont un effet nettement plus prononcé sur la formation du  $\Delta\text{pH}$  ( $\text{IC}_{50} \approx 1 \text{ mM}$ ) que sur les réactions photochimiques du PSII ( $\text{IC}_{50} \approx 80$  et  $130 \text{ mM}$  pour  $\Delta\text{F}/\text{Fm}'$  et  $\text{Fv}/\text{Fm}$  respectivement). De plus, le fait que les cinétiques de relaxation du Q-9AA suivant la période d'illumination des thylacoïdes traités à l'AAPH étaient significativement plus rapides que celles des thylacoïdes contrôles supportent bien l'effet découpleur des RL générés par l'AAPH. Selon les valeurs des  $\text{IC}_{50}$ , la formation du  $\Delta\text{pH}$  serait environ 100 fois plus sensible que les réactions photochimiques et celles du transport d'électrons aux RL

générés par l'AAPH. Puisqu'il existe une grande différence de sensibilités du  $\Delta pH$  et du transport d'électrons, la méthode d'Evron et McCarty (2000) n'a donc pas pu démontrer simultanément les inhibitions de ces deux réactions.

Pour expliquer une telle différence de sensibilités du  $\Delta pH$  et du transport d'électrons vis-à-vis les RL générés par l'AAPH, il faut noter que ces derniers sont de nature hydrophile (Mino *et al.*, 1988). On peut donc assumer que ces RL ne pénètrent pas la membrane des thylacoïdes, mais qu'ils attaquent les lipides membranaires de la monocouche externe. Ainsi, l'intégrité des thylacoïdes serait affectée, augmentant la perméabilité membranaire des  $H^+$  et donc inhibant la formation du  $\Delta pH$ . L'effet plutôt superficiel des RL générés par l'AAPH expliquerait pourquoi les protéines intrinsèques composant les centres réactionnels des photosystèmes I et II et celles du complexe Cyt  $b_6f$  seraient moins exposées aux effets toxiques des RL produits par l'AAPH.

Il est intéressant de mentionner que dans l'étude de Mino *et al.* (1988), les RL générés par l'AAPH causaient l'hémolyse de 50 % des globules rouges (érythrocytes) pour une concentration d'environ 37 mM d'AAPH après une heure à 37 °C, ce qui est bien supérieur à la sensibilité du  $\Delta pH$  observé dans ce mémoire ( $IC_{50} \approx 1$  mM). De plus, des gels d'électrophorèse présentés dans l'étude de Mino *et al.* (1988) indiquait que les RL générés par l'AAPH causaient une polymérisation lipides-protéines, ce qui pourrait expliquer l'inhibition des réactions photochimiques du PSII et du transport d'électrons. Enfin, il importe de mentionner que toujours dans cette étude de Mino *et al.*, les RL générés par le système xanthine-xanthine oxydase étaient plus efficaces à causer l'hémolyse des érythrocytes prononcés que ceux produits par l'AAPH. Aussi, les RL provenant du système xanthine- xanthine oxydase causait la diminution (dégradation) des lipides membranaires (surtout la phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine), contrairement aux RL produits par l'AAPH. Ainsi, il faut prendre note que les RL sont de natures variées et qu'ils peuvent donc avoir des effets différents sur les systèmes biologiques.

Bien que mes résultats avec l'AAPH aient été obtenus dans des conditions *in vitro*, il est important de discuter des conséquences physiologiques d'une plus grande sensibilité du  $\Delta pH$  que le transport d'électrons vis-à-vis les RL. Tout d'abord, il est évident qu'une inhibition du  $\Delta pH$  empêcherait la synthèse de l'ATP, et conséquemment, la réduction du  $CO_2$  en trioses-P lors du cycle de Calvin. En effet, une molécule d'ATP (et une de NADPH) est requise pour la réduction de 3-phosphoglycérate en 3-glycéraldéhyde lors de la phase de la réduction du cycle de Calvin. Une autre molécule d'ATP est requise lors de la phase de régénération du 1,5-rubilose-biphosphate (Taiz et Zeiger, 2006). Une conséquence pratique de cette plus grande sensibilité du  $\Delta pH$  serait que les mesures du taux de transport d'électrons ou de l'efficacité photochimique effective du PSII ( $\Delta F/F_m'$ ) pourraient sous-estimer l'inhibition de la photosynthèse (taux d'assimilation de  $CO_2$ ) causée par les stress environnementaux.

Une autre conséquence de l'inhibition du  $\Delta pH$  par les radicaux libres serait la perte d'efficacité de carboxylation de la RUBISCO. En effet, cette enzyme est sous une forme inactive à l'obscurité et doit être activée à la lumière. Son activation requiert la formation du  $\Delta pH$ , qui provoque : a) l'alcalinisation du stroma et b) une sortie des ions  $Mg^{2+}$  du lumen vers le stroma. Or, un pH alcalin et les ions  $Mg^{2+}$ , en association avec l'enzyme RUBISCO activase, sont essentiels à l'activation de la RUBISCO (Lorimer *et al.*, 1976; Portis, 1992; Taiz et Zeiger, 2006). Donc en plus de limiter les phases de réduction et de régénération du Cycle de Calvin, la phase de carboxylation serait aussi affectée par les RL.

Enfin, il faut aussi mentionner que l'inhibition du  $\Delta pH$  par les RL affecterait la régulation de l'énergie absorbée. Lorsque l'énergie absorbée excède la capacité d'assimilation de la photosynthèse, l'acidification du lumen est nécessaire pour activer l'enzyme violaxanthine dé-époxydase, qui à l'aide de l'ascorbate, transforme la violaxanthine en zéaxanthine. Cette dernière, en interaction avec la protéine psbS, augmente la dissipation non-photochimique (c.-à-d. sous forme de chaleur) de l'excès d'énergie absorbée au niveau des antennes pigments-protéines collectrices de lumière. Ceci a pour conséquence importante d'éviter la sur-réduction des transporteurs

d'électrons et la fermeture des centres réactionnels des PSII (Demmig-Adams et Adams III, 2006). Il est bien démontré que ces réactions ont un rôle photoprotecteur. Donc, on peut suggérer qu'une inhibition du  $\Delta pH$  par les RL diminuerait la dissipation non-photochimique de l'excès d'énergie absorbée et augmenterait ainsi la susceptibilité de l'appareil photosynthétique à la photoinhibition.

Si l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* avec l'AAPH à un niveau physiologique dans le chloroplaste reste à vérifier, de nombreuses observations rapportées dans la littérature semblent supporter l'idée que la formation du  $\Delta pH$  est particulièrement sensible aux différentes conditions environnementales favorisant le stress oxydatif. Tout d'abord, il a été rapporté que l'un des premiers effets d'un traitement modéré des thylacoïdes à la chaleur (35-45 °C) était un découplage des thylacoïdes (inhibition de la photophosphorylation) due à la désorganisation des membranes, ce qui entraînait un changement dans l'état rédox des donneurs d'électrons du PSII (Bukhov et Mohanty, 1993). Ceci est cohérent avec nos observations préliminaires indiquant que l'un des premiers effets du vieillissement de nos thylacoïdes d'épinard était la diminution du  $\Delta pH$ , un effet notable bien avant celui de la baisse de  $\Delta F/F_m'$  (résultats non-présentés).

En plus de la chaleur, il a été observé chez des protoplastes et des chloroplastes isolés de feuilles *Valerianella locusta* L. acclimatées ou non au froid, que la photophosphorylation était plus sensible au gel que le transport d'électrons (Rumich-Bayer et Krause, 1986). Cependant, il semble dans ce cas que le facteur de couplage (ATPsynthase) était plus affecté que l'intégrité membranaire. Des observations comparables ont aussi été rapportées chez des thylacoïdes isolés à partir de feuilles de concombres (*Cucumis sativus* L.) exposées à 5 °C sous lumière modérée : un tel traitement causait le découplage de ces thylacoïdes sans changement significatif de la capacité de transport d'électrons.

En plus des températures extrêmes, il a été rapporté que la photophosphorylation était plus sensible que le transport d'électrons chez des feuilles de *Dimorcarpus*



*longana* Lour traitées aux pluies acides simulées (Qiu, et Liu, 2002). Enfin, mentionnons que chez des aiguilles d'épinette de Norvège exposées au perchloroéthylène, ce polluant atmosphérique était converti en acide trichloroacétique qui lui inhibait la photosynthèse principalement à cause de son effet découpleur (Weissflog *et al.*, 2007).

Ces quelques études montrent directement que plusieurs stress environnementaux peuvent avoir un effet découpleur plus important qu'un effet inhibiteur du transport photosynthétique d'électrons. Tel que mentionné plus haut, une des conséquences de cet effet découpleur est l'inhibition de la dissipation non-photochimique de l'énergie absorbée (quenching non-photochimique, qNP), entraînant une baisse prononcée du quenching photochimique (qP), c.-à-d. une hausse de la fermeture des centres réactionnels du PSII (1-qP). Un examen de la littérature indique plusieurs stress oxydatifs affectent préférentiellement qP par rapport à qNP. En effet, Pádua *et al.* (2010) ont observé que le cuivre (5  $\mu\text{M}$ ) chez des chloroplastes d'épinards provoquait une baisse marquée non seulement de qP mais aussi de qNP. De plus, chez des plants de tournesol, le cuivre (75  $\mu\text{M}$ ) présent dans la solution nutritive causait une inhibition plus marquée de l'assimilation de  $\text{CO}_2$  que du paramètre  $\Delta F/F_m'$  (Yaakoubi *et al.*, 2010) : une telle divergence suggère que le cuivre peut avoir un effet découpleur affectant l'assimilation de  $\text{CO}_2$  plus marqué qu'un effet inhibiteur du transport d'électrons.

Par ailleurs, l'étude de Calatayud *et al.* (2002) a montré que l'exposition de trois variétés de choux à différentes concentrations d'ozone pendant un mois a causé des dommages oxydatifs (peroxydation lipidique, perte de liquide cellulaire) accompagnés d'une inhibition de la photosynthèse. Fait intéressant, l'altération de l'intégrité membranaire diminuait la capacité des cultivars sensibles à développer le quenching non-photochimique (qNP) pendant que la fermeture des centres réactionnels du PSII (1-qP) augmentait. Une autre étude a démontré qu'en présence de stress hydrique, l'ozone provoquait chez des plants de blé une baisse du quenching photochimique qP tandis que qNP demeurerait inchangé (Xu *et al.*, 2007).

Enfin, nous pouvons mentionner que l'aluminium causait chez des feuilles de semis de tangerine (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka) un effet nettement plus marqué sur le quenching photochimique qP (diminution) que sur qNP (Chen *et al.*, 2005). Enfin, des observations similaires ont été rapportées par Tezara *et al.* (2003) chez l'arbuste *Lycium nodosum* soumis à une combinaison de stress hydrique et salin.

#### **4.3 Effets de l'acide salicylique sur le transport d'électrons et le gradient de protons**

Notre dernière partie nous a permis de démontrer les effets découpleur et inhibiteur de l'AS sur la chaîne de transport d'électrons de thylacoïdes d'épinard. Après une incubation de 15 min à 23 °C, nos résultats obtenus indiquent que l'AS agit à la fois en tant que découpleur et inhibiteur de la chaîne de transport d'électrons. De plus, comme pour l'AAPH, l'AS affecte davantage la formation du  $\Delta pH$  ( $IC_{50} \approx 0,3$  mM) que le transport d'électrons ( $IC_{50} \approx 2-3$  mM). Et pour les concentrations inférieures à 1 mM, l'AS semble même stimuler le transport d'électrons photosynthétique tel qu'estimé par la méthode de Evron et McCarty (2000), cette stimulation étant significative à 0,3 mM. Il importe de mentionner que ces effets ont observé à des concentrations d'AS supérieures à celles retrouvées dans les chloroplastes, mais à des temps d'exposition plus courts que dans des conditions physiologiques. Il s'agit donc d'un traitement aigu (*in vitro*) plutôt que d'un traitement chronique (*in vivo*). Même si nos observations réalisées *in vitro* restent à être validées pour des conditions physiologiques, elles apportent un nouvel élément qui pourrait permettre éventuellement le mode d'action de l'AS en tant que phytohormone.

L'AS est une phytohormone impliquée dans diverses réponses métaboliques et physiologiques affectant la croissance et le développement des plantes. L'AS joue un rôle clé notamment dans la réponse des plantes contre l'attaque des pathogènes et est reconnue comme activateur de l'acclimatation des plantes aux stress oxydatifs. De plus, de nombreuses études ont démontré que l'application d'AS exogène à des concentrations optimales stimulait l'efficacité antioxydante des plantes et favorisait ainsi la résistance

des plantes à diverses conditions de stress environnementaux tels que la salinité, les métaux lourds, l'ozone, etc. (Hayat *et al.*, 2010).

Quoique l'AS joue un rôle essentiellement bénéfique pour la plante, ses effets découpleurs et inhibiteurs présentés dans ce mémoire sont cohérents avec ceux de la littérature. Dans notre cas les valeurs des concentrations d'AS qui allait jusqu'à 10 mM n'était pas chronique pour nos thylacoïdes, on s'est référé à l'étude de Norman (2004) qui démontre l'effet découpleur et inhibiteur de l'AS sur la chaîne de transport d'électrons mitochondriale chez le tabac. Notre étude nous a permis pour la première fois à notre connaissance de démontrer l'effet découpleur de l'AS dans des thylacoïdes. Cet effet sur la formation du  $\Delta pH$  ne peut être causé par son effet inhibiteur du transport photosynthétique d'électrons pour deux raisons : 1) l'AS accélère significativement la relaxation du quenching du 9-aminoacridine (q9AA) à la fin de la période d'illumination, indiquant une diffusion plus rapide des  $H^+$  à travers les thylacoïdes, et 2) l'effet de l'AS sur la formation du  $\Delta pH$  est observé à des concentrations environ 10 fois inférieures à celles requises pour inhiber le transport d'électrons.

Ainsi, l'effet découpleur de l'AS démontré pour la première fois dans les thylacoïdes est cohérent avec ceux observés dans de nombreux systèmes. En effet, l'effet découpleur de l'AS avait déjà été démontré dans des mitochondries (Norman *et al.*, 2004; Xie et Chen 1999). Aussi, il a été démontré que l'AS dissipait le gradient de pH au niveau de la membrane plasmique de cellules de racines de blé (Gordon *et al.*, 2004). Un effet similaire sur le  $\Delta pH$  de cellules de la muqueuse gastrique a aussi été rapporté (Olender *et al.*, 1986). Selon Balasubramanian *et al.* (1997) ayant caractérisé les effets de l'AS sur les propriétés physiques de membranes naturelles et artificielles, l'effet découpleur de l'AS découle de son effet fluidifiant des doubles-couches lipidiques suite à son incorporation à l'interface des régions hydrophobes et hydrophiles des biomembranes.

Quant à l'effet inhibiteur de l'AS sur le transport d'électrons, il avait déjà été observé dans des mitochondries (Norman *et al.*, 2004). Comme dans les thylacoïdes, cet

effet inhibiteur est observé à des concentrations supérieures à celles requises pour diminuer le  $\Delta pH$ . Contrairement à son effet découpleur, l'effet inhibiteur de l'AS avait déjà été rapporté dans des thylacoïdes de tabac (Janda *et al.*, 2012). Cependant, les effets de l'AS étaient plus prononcés sur les feuilles entières traitées à l'AS que sur des thylacoïdes isolés, suggérant un effet surtout indirect de l'AS sur le transport d'électrons.

Enfin, dans une autre étude (Saeedi *et al.*, 2013) portant sur les réponses de l'appareil photosynthétique chez des feuilles de blé traitées à différentes concentrations d'AS, il a été observé que l'AS stimulait le transport d'électrons catalysé par le PSII à toutes les concentrations testées. Cependant, les plus fortes concentrations d'AS induisaient un effet découpleur ainsi qu'une inhibition du transport d'électrons au niveau du cytochrome *f*. De plus, comme dans l'étude de Janda *et al.* (2012) l'incubation des thylacoïdes isolés avec l'AS n'a produit aucun effet inhibiteur, indiquant un effet plutôt indirect de l'AS sur le transport d'électrons.

Dans ce mémoire, nous avons observé un effet inhibiteur direct sur le transport d'électrons par l'AS à des concentrations supérieures à 3 mM. Fait intéressant, l'AS à de faibles concentrations (0,3 mM) causait une stimulation significative du taux de transport d'électrons tel que mesuré par la méthode de Evron et McCarty (2000). Cet effet stimulateur peut difficilement être attribué à l'effet découpleur de l'AS levant une possible restriction du transport d'électrons causée par l'acidification du lumen des thylacoïdes. Un tel effet est improbable puisque l'effet découpleur du  $NH_4Cl$  n'était pas accompagné d'une stimulation du taux de transport d'électrons tel que discuté à la section 4.1. Une possible explication de la stimulation du transport d'électrons induite par l'AS à de faibles concentrations pourrait être une augmentation de la fluidité membranaire tel que démontré par Balasubramanian *et al.* (1997) : une plus grande fluidité favoriserait la diffusion des molécules de plastoquinones entre les PSII et les complexes Cyt  $b_6f$ .

#### 4.4 Possible rôle physiologique du découplage des thylacoïdes par les radicaux libres et l'acide salicylique

Les radicaux libres sont considérés principalement comme des molécules cytotoxiques que les plantes ont intérêt à minimiser, voire éliminer. Pourtant, le rôle bénéfique des radicaux libres est de plus en plus accepté en tant que messagers secondaires impliqués dans les mécanismes d'acclimatation des végétaux en réponse aux stress environnementaux (Foyer et Noctor 2009). Un tel rôle bénéfique des radicaux libres est similaire à celui de l'AS stimulant l'acclimatation des plantes aux stress. En fait, il a été démontré que la protection induite par l'AS contre le cadmium dépendait du  $H_2O_2$  généré par une NADPH oxydase située au niveau de la membrane plasmique (Chao *et al.*, 2010). Puisque les radicaux libres ainsi que l'AS 1) agissent comme des molécules signal menant à l'acclimatation des plantes aux stress, et 2) ont un effet découpleur dans les thylacoïdes, il est permis de poser la question suivante : est-ce que le découplage des thylacoïdes pourrait avoir un effet positif menant à l'acclimatation des végétaux contre les stress environnementaux?

Tel que mentionné plus haut, une des conséquences du découplage des thylacoïdes est l'inhibition de la dissipation non-photochimique de l'énergie absorbée. Un plus grand flux d'énergie dans les centres réactionnels provoque plus de réactions photochimiques menant à une plus grande réduction des transporteurs de la chaîne d'électron. Or il a été démontré qu'une plus grande réduction des molécules de plastoquinones favorise l'activation des enzymes antioxydants (Robert *et al.*, 2009) ainsi que l'accumulation de polyphénols, des molécules s'accumulant sous conditions de stress et ayant un fort potentiel antioxydant (Robert *et al.*, 2009).

Il est raisonnable de suggérer que le découplage des thylacoïdes ne représente pas qu'un phénomène néfaste pour l'appareil photosynthétique, mais permet plutôt d'induire différents mécanismes de régulations. En effet, il est bien connu que l'efficacité de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries est fortement régulée selon les conditions physiologiques et environnementales par une oxydase alternative (Rasmusson *et al.*, 2009) ainsi que par des protéines découpleurs (Sweetlove *et al.*, 2006). Une telle

régulation permet notamment de maintenir l'équilibre entre le pouvoir réducteur de la photosynthèse et la capacité oxydative de la respiration. De plus, l'état rédox des molécules de plastoquinones qui deviennent plus réduites dans des thylacoïdes découplés constitue un signal rédox significatif dans les mécanismes de régulation (Foyer et Noctor 2009).

Notre projet de maîtrise nous a permis de mieux comprendre les effets inhibiteurs des radicaux libres et de l'acide salicylique sur les fonctions des thylacoïdes, spécifiquement, sur le transport photosynthétique d'électrons et le gradient transmembranaire de protons. La formation du gradient de pH semble plus sensible que le transport photosynthétique d'électrons aux stress environnementaux.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen JF, Forsberg J (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. Trends Plant Sci., vol. 6, p. 317-320.
- Badenhorst PW, Amory AM, Hockett BI (1998) Light regulation of native and *Escherichia coli* glutathione reductase in transgenic tobacco. Journal of Plant Physiology 152(4-5): 502-509.
- Balasubramanian SV, Straubinger RM, Morris M E (1997) Salicylic Acid Induces Changes in the Physical Properties of Model and Native Kidney Membranes. Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 86, No. 2, February 1997.
- Bechtold U, Karpinski S, Mullineaux P (2005) The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signalling responses in plant-biotrophic pathogen interactions. Plant Cell Environ 28: 1046-1055.
- Bukhov NG, Mohanty P (1993) Analysis of the Heat Stress Induced Quenching of Variable Chlorophyll a Fluorescence in Beet Spinach Leaves: Possible Accumulation of Oxidized Quencher P680+ under High Illumination. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology: p. 111-116.
- Cadenas E, Davies JA (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.
- Calatayud A, Alvarado J W, Barreno E (2002) Differences in ozone sensitivity in three varieties of cabbage (*Brassica oleracea* L.) in the rural Mediterranean area. J. Plant Physiol. 159. 863-868.
- Chao YY, Chen CY Huang WD, Kao C H (2010) Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves Plant Soil 329, 327-337.
- Chen GX, Kazimir J, Cheniae GM (1992) Photoinhibition of Hydroxylamine-Extracted Photosystem II Membranes: Studies of the Mechanism. Biochemistry 31: 11072-11083.
- Chen LS, Ping YI-QI, Brandon Rhett S, Xing-Hui Liu (2005) Aluminum-induced decrease in CO<sub>2</sub> assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO<sub>2</sub> assimilation. Tree Physiology. 25(3): p. 317-324.

- Crichton R, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ (2002) Molecular and cellular mechanisms of ironhomeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91, (1): 9-18.
- Dalle Donne (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52: 601-623.
- Davey MW, Van Montagu M, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, SmimoffN, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J (2000) Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the science of food and agriculture* 80: 825-860.
- Dean RL, Miskiewicz E (2003) Rates of Electron Transport in the Thylakoid Membranes of Isolated, Illuminated Chloroplasts Are Enhanced in the Presence of Ammonium Chloride. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31(6), 410-417.
- Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1706, p. 12-39.
- Demmig-Adams B, Adams III WW (2006) Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist* 172: 11-21.
- Dhalla N S, Temsah R M, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases, 655-673.
- Evron Y, McCarty RE (2000) Simultaneous Measurement of DpH and Electron Transport in Chloroplast Thylakoids by 9-Aminoacridine Fluorescence 1,2. *Plants physiology* vol. 124.
- Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A (2003) Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*. 41: 281-284.
- Foyer CH, Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling*. 11(4): p. 861-905.
- Genty B, Briantais J M, Baker N R (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of fluorescence. *Biochimica Biophysica Acta* 990: 87-92.



- Genty B, Harbison J (1996) Regulation of light utilization for photosynthetic electron transport. In NR Baker, ed, *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 67-99.
- Gordon LK, Minibayeva FV, Rakhmatullina DF, Alyabyev AJ, Ogorodnikova TI, Loseva NL, Valitova YN (2004) Heat production of wheat roots induced by the disruption of proton gradient by salicylic acid. *Thermochimica Acta* 422 (2004) 101-104.
- Halliwel B, Gutteridge J (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon. Press: 188-275.
- Halliwel B, Gutteridge J (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed, Oxford University Press.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment. *Environmental and Experimental Botany* 68 (2010) 14-25.
- Heldt HW (1979) Light-dependent changes of stromal  $H^+$  and  $Mg^{+2}$  concentration controlling  $CO_2$  fixation. In M Gibbs, E Latzko, eds, *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 6. Springer-Verlag, Berlin, pp 202-207.
- Horton H R, Moran L A, Ochs R S, Rawn J D, Scrimgeour K G (1994). *Principes de Biochimie* 2: 8041-1578.
- Janda T, Szalai G, Tari I, Paldi E (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta Berlin* 208: 175-180.
- Janda K, Hidega E, Szalai G, Kovacs L, Janda T (2012) Salicylic acid may indirectly influence the photosynthetic electron transport.
- Krause GH, Weis E (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology II interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis research* 5: 139-57.
- Kurisu G, Zhang H, Smith J L, Cramer W A (2003) Structure of the cytochrome  $b_6f$  complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* 302: 1009-1014.
- Lorimer GH, Badger MR, Andrews TJ (1976) The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochemistry* 15: 529-536.

- Malkin R, Niyogi KK (2000) Photosynthesis, in Biochemistry and molecular biology of plants American Society of Plant physiologists: 568-628.
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence -a practical guide. Journal of Experimental Botany 51: 659-668.
- Melis A (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*.
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J (1994) Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, Free Rad. Biol. Med., 17: 235-248.
- Mino M, Miki M, Tamai H, Yasuda H, Maeda H (1988) Membrane damages in erythrocytes induced by radical initiating reactions and the effects of tocopherol as radical scavenger. In: Lipid Peroxidation in Biological Systems. Ed. A. Sevanian. pp. 51-70. ISBN 0-935315-18-7.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance". Trends Plant Sei., vol. 7, p. 405-410.
- Mustardy L, Garab G (2003) Granum revisited. A three-dimensional model where things faH into place. Trends Plant Science (8): 117-122.
- Nield J (1997) Structural Characterisation of Photosystem II. Ph. D. Thesis .University of London, London, UK.
- Nishiyama Y, Allakhverdiev S I, Murata N (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in photo inhibition of photo system II. Biochimica BiophysicaActa 1757: 742-749.
- Niyogi K K (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., vol. 50, p. 333-359.
- Nobel PS (1999) Physicochemical and environmental plant physiology, Ed 2nd. Academic Press, San Diego.
- Norman C, Howell KA, Millar AH, Whelan JM, Day DA (2004) Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. Plant Physiology. 134: 492-501.

- Olender EJ, Woods D, Kozol R, Fromm D (1986) Salicylate effects on proton gradient dissipation by isolated gastric mucosal surface cells (42402). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 183(2): p. 177-185.
- Pádua M, Cavacab AM, Aubert S, Bligny R, Casimiro A (2010) Effects of copper on the photosynthesis of intact chloroplasts: Interaction with manganese. *Physiologia Plantarum*. 138(3): p. 301-311.
- Paincemail J, Meurisse M, Limer R, Efraigne JO (1999) Mesure et utilisation des antioxydants en medecine humaine *Medisphere*, 1-4.
- Parent C, Capelli N, Dat J (2008) Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. R. Biologies* 331, 255-261.
- Poor P, Gemes K, Horva F, Szepesi A, Simon ML, Tari I (2010) Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO<sub>2</sub> fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress.
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384-394.
- Portis ARJ (1992) Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 415-437.
- Prior RL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 53: 4290-302.
- Qiu D, Liu X (2002) Effects of simulated acid rain on chloroplast activity in *Dimorcarpus longana* Lour. cv. wulongling leaves. *Chinese Journal of Applied Ecology*. 13 (12): p. 1559-1562.
- Rasmusson AG, Fernie AR JT, Dongen V (2009) Alternative oxidase: A defence against metabolic fluctuations *Physiologia Plantarum*. 137(4): p. 371-382.
- Robert G, Melchiorre M, Racca R, Trippi V, Lascano HR (2009) Apoplastic superoxide level in wheat protoplast under photooxidative stress is regulated by chloroplast redox signals: Effects on the antioxidant system. *Plant Science*, 177(3): p.168-174.

- Rumich-Bayer S, Krause GH (1986) Freezing damage and frost tolerance of the photosynthetic apparatus studied with isolated mesophyll protoplasts of *Valerianella locusta* L. *Photosynthesis Research*. 8(2): p. 161-174.
- Saeedi S, Rocher F, Bonmort J, Fleurat-Lessard, Roblin G (2013) Early membrane events induced by salicylic acid in motor cells of the *Mimosa pudica* pulvinus. *Journal of Experimental Botany*. 64(7): p. 1829-1836.
- Sahu GK, Kar M, Sabat SC (2002) Electron transport activities of isolated thylakoids from wheat plants grown in salicylic acid. *Plant boil.* (4): 321-328.
- Shakirova FM (2007) Role of hormonal system in the manifestation of growth promoting and anti-stress action of salicylic acid.
- Shi Q, Zhu Z (2007) Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany* 63 (2008) 317-326.
- Slovacek RE, HIND G (1980) Energetic Factors Affecting Carbon Dioxide Fixation in Isolated Chloroplasts. *Plant Physiol.* 65, 526-532.
- Sweetlove LJ, Lytovchenko A, Morgan M, Nunes-Nesi A, Taylor N L, Baxter C J, Eickmeier I Fernie A R (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51): p. 19587-19592.
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*: Sinauer Associates Inc., USA.
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*. 4ed. The Benjamin/Cummings Publishing Compagn Inc USA, 764 pages.
- Tezara W, Martiane D , Rengifo E, Herrera A (2003) Photosynthetic responses of the tropical spiny shrub *Lycium nodosum* (Solanaceae) to drought, soil salinity and saline spray. *Annals of Botany*. 92(6): p. 757-765.
- Uzunova AN, Popova LP (2000) Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica Prague* 38: 243-250.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell Biochem* , 266: 37-56.
- Valco M, Rhodes C, Moncol J, Zakovic I M, Mazur M (2006) Free Radicals Metals and of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plants, Cell and Environnement* 31(2), 244-257.

- Vichnevetskaia, K. D. and D. N. Roy (1999) Oxidative stress and antioxidative defence with an emphasis on plants antioxidants. *Environ. Rev.*, vol. 7, p. 3-51.
- Weissflog L, Krüger GH, Forczek J, Lange ST, Kotte CA, Pfennigsdorff K, Rohlenová A, Fuksová J, Uhlířová K, Matucha H, Schröder M (2007) Oxidative biodegradation of tetrachloroethene in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *South African Journal of Botany*. 73(1): p. 89-96.
- Whitelegge J P, Zhang H, Aguilera R, Taylor R M, Cramer W A (2002) Full subunit coverage liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LCMS<sup>+</sup>) of an oligomeric membrane protein: cytochrome b6f complex from spinach and the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*, *Molecular and cellular proteomics* 10: 816-827.
- Whitmarsh J, Ort DR (1984) Stoichiometries of electron transport complexes in spinach chloroplasts. *Archives of biochemistry and biophysics* 231: 378-389.
- Whitmarsh J, Govindjee (1999) The photosynthetic process. *Concept in Photobiology Photosynthesis and Photomorphogenesis*.
- Xie Z, Chen Z (1999) Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol* 120: 217-226.
- Xu H, Biswas DK, Chen WD, LI SB, Zhang L, Jiang GM, Li YG (2007) Photosynthesis and yield responses of ozone-polluted winter wheat to drought. *Photosynthetica* 45(4): p. 582-588.
- Yaakoubi H, Samson G, Ksontini M, Chaibi W (2010) Localized increases of polyphenol concentration and antioxidant capacity in relation to the differential accumulations of copper and cadmium in roots and in shoots of sunflower.